

**Natürliche Killerzellen:  
Beiträge zum Verständnis ihrer Funktion für die  
Schwangerschaft**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

2009

von Yvonne Maier  
geboren am 06.12.1981 in Ulm

## **Gutachter**

- 1. Herr PD U. Markert**
- 2. Frau PD Dr. C. Hipler**
- 3. Frau PD Dr. B. Toth**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.06.2010**

Für meinen Opa, Wilhelm Störzer  
(9.12.1925 – 9.4.2009)

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	Cluster of Differentiation
dNK-Zellen	deziduale Natürliche Killerzellen
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
E2	Östrogen
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immusorband Assay
ER	Östrogenrezeptor
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
hCG	Human Chorionic Gonadotropin
HLA	Human Leucocyte Antigene
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IGF-II	Insulin-like Growth Factor II
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-inducible Protein-10
ITAM	Immunoreceptor-Tyrosin-based-Activation Motive
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motifs
IVF	In vitro Fertilisation
JAK	Januskinase
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
KIR	Human Killer Immunoglobulin-like Receptor
LECAM-1	Leukocyte Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
LIF	Leukemia Inhibitory Factor



## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

---

MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Macrophage-Inflammatory Protein
mRNA	messenger Ribonucleid acid
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NCR	Natural Cytotoxicity Triggering Receptor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBNK	NK-Zellen des peripheren Blutes
PIBF	Progesteron-induced Blocking Factor
P4	Progesteron
p.c.	postcoitus
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STATs
PLC	Phospholipase C
PLGF	Placental Growth Factor
pNK-Zellen	periphere Natürliche Killerzellen
PRL	Prolaktin
RLH	Retinoic-acid inducible gene I-like helicases
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
SCR	Scrambled
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF	Transforming Growth Factor
Th1/Th2	T-Helferzellen Typ1/Typ2
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## **Inhaltsverzeichnis**

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Grundprinzipien des Immunsystems.....</b>	<b>5</b>
2.1.1	Angeborene und erworbene Immunabwehr.....	5
2.1.2	Humorale und zellvermittelte Immunantwort.....	6
<b>2.2</b>	<b>Die Reproduktion.....</b>	<b>8</b>
2.2.1	Entwicklung des Embryo: Implantation und Plazentation.....	8
2.2.2	Immunologie der Placenta.....	10
2.2.3	Funktion der Apoptose.....	12
<b>2.3</b>	<b>Das TH1 – TH2 Gleichgewicht.....</b>	<b>12</b>
<b>2.4</b>	<b>Hormone, Wachstumsfaktoren und Cytokine.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5</b>	<b>Signaltransduktionswege und deren Regulierung.....</b>	<b>17</b>
<b>2.6</b>	<b>Die MHC-Moleküle.....</b>	<b>19</b>
2.6.1	Die MHC-Klassen I und II.....	19
2.6.2.	Das nicht-klassische HLA-G Molekül.....	20
<b>2.7</b>	<b>Natürliche Killerzellen.....</b>	<b>20</b>
2.7.1	Abstammung, Morphologie und Funktionsprinzipien.....	21
2.7.2	NK-Zellrezeptoren und ihr Zytokinprofil.....	22
2.7.3	Die Granula der Natürlichen Killerzellen und ihre Funktion.....	24
2.7.4	Natürliche Killerzellen im peripheren Blut.....	25
2.7.5	Natürliche Killerzellen in der Plazenta.....	25
<b>2.8</b>	<b>Bedeutung für die Klinik.....</b>	<b>28</b>

<b>3.</b>	<b>Ziele dieser Arbeit.....</b>	<b>30</b>
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Biologische Materialien.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Geräte und Reagenzien.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Methodenübersicht.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4</b>	<b>Isolierung von sHLA-G.....</b>	<b>42</b>
4.4.1	Antikörperproduktion W6/32.....	42
4.4.2	W6/32 beschichtete Sepharosekügelchen.....	42
4.4.3	HLA-G1s Reinigung aus 221.G1s Zellkulturüberständen.....	43
<b>4.5</b>	<b>Isolierung von Lymphozyten und NK-Zellen.....</b>	<b>44</b>
<b>4.6</b>	<b>Funktionelle Analysemethoden.....</b>	<b>45</b>
4.6.1	Durchflusszytometrie.....	45
4.6.2	Expression cytotoxizitäts-assozierter Protein.....	45
4.6.3	Expression von CD160.....	46
4.6.4	Expression von CD56/16.....	46
<b>4.7</b>	<b>Serumanalyse.....</b>	<b>47</b>
<b>4.8</b>	<b>Biopsieentnahme aus dem Endometrium.....</b>	<b>47</b>
<b>4.9</b>	<b>Fixierung und Dehydrierung der Proben des Endometriums.....</b>	<b>48</b>
<b>4.10</b>	<b>Paraffin-Einbettung und Aufbereitung der Objektträger.....</b>	<b>48</b>
<b>4.11</b>	<b>Hematoxilin-Eosin Färbung.....</b>	<b>49</b>
<b>4.12</b>	<b>Immunhistochemische Reaktion zur Detektion von Bcl-2.....</b>	<b>49</b>
<b>4.13</b>	<b>Immunhistochemische Reaktion zur Detektion von Bax.....</b>	<b>50</b>
<b>4.14</b>	<b>Färbung der Bcl-2, Bax und Fas-L Antigene.....</b>	<b>50</b>
<b>4.15</b>	<b>Auswertung der Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1</b>	<b>Expression von CD160 auf NK-Zellen.....</b>	<b>52</b>

<b>5.2</b>	<b>Zytotoxizität im Zusammenhang mit der Expression Zytotoxizitäts-assoziiierter Proteine.....</b>	<b>55</b>
<b>5.3</b>	<b>Einflüsse auf Anzahl und Verteilung cytotoxischer und regulatorischer NK-Zellen in der Dezidua.....</b>	<b>57</b>
5.3.1	Der Einfluss über die Stimulation von Ovarien.....	57
5.3.2	Der Einfluss einer lokalen Verletzung endometrialen Gewebes.....	59
5.3.3	Der Zusammenhang mit immunregulatorischen Zytokinen am Bsp. von IL-6.....	60
<b>5.4</b>	<b>Die Rolle von NK-Zellen im Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen bei wiederholten Spontanaborten.....</b>	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>66</b>
<b>6.1</b>	<b>Regulation dezidualer NK-Zellen.....</b>	<b>66</b>
<b>6.2</b>	<b>Wirkungsweise dezidualer NK-Zellen.....</b>	<b>67</b>
<b>6.3</b>	<b>NK-Zellen und ihre klinische Relevanz.....</b>	<b>69</b>
6.3.1	Stimulation der Ovarien und lokale Verletzung als Einflussgrößen auf NK-Zellen und das immunologische Gleichgewicht .....	69
6.3.2	Wiederholte Spontanaborte im Zusammenhang mit Progesteron und apoptotischen Prozessen.....	71
<b>6.4</b>	<b>Arbeit mit Zelllinien und isolierten Zellen aus Blut, Plazenta und Endometrium.....</b>	<b>73</b>
<b>6.5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>85</b>

Danksagung

Lebenslauf

Ehrenwörtliche Erklärung

# 1. Zusammenfassung

**Einleitung** Die Schwangerschaft stellt aus immunologischer Sicht einen Konflikt dar, den die Natur in der Regel bewältigt, ohne, dass wir bis heute alle Details in ihren Zusammenhängen verstehen. Viel deutet darauf hin, dass eine exakte Feinregulation des Immunsystems in der Dezipua, an der feto-maternalen Grenzfläche, grundlegend für eine erfolgreiche Schwangerschaft ist. Dabei stellt sich nicht nur die Frage, wie das Immunsystem die Entwicklung des Embryos reguliert, sondern auch, welche Einflüsse auf die Immunzellen einwirken und diese steuern.

Natürliche Killerzellen sind in großer Anzahl im Endometrium bzw. in der Plazenta vorhanden. Es wird angenommen, dass sie für die Schwangerschaft eine wichtige Funktion erfüllen, die über ihre Rolle zu der Bekämpfung pathogener Infektionen hinausgeht. Bisherige Versuche zeigten eine Korrelation der dezidualen NK-Zell Proliferation mit Progesteron und ein gehäuftes Vorkommen im Zeitfenster der Implantation. Dabei geht man davon aus, dass sie keinen direkten Einfluss auf die Implantation des Embryos nehmen, sondern die Trophoblasteninvasion kontrollieren und damit die vaskulären Umbauvorgänge steuern.

**Ziele** Ziel dieser Arbeit war es physiologische wie auch pathologische Funktionen der dezidualen NK-Zellen im Verlauf einer Schwangerschaft zu untersuchen. Es sollte ein Zusammenhang mit aktivierenden Rezeptoren, Signaltransduktionsmolekülen, Apoptose- und Zytotoxizitäts-assoziierten Proteinen, sowie Schwangerschaftshormonen als Einflussgrößen auf NK-Zellen gesucht werden, denen eine Bedeutung für die Schwangerschaft und/oder die Zytotoxizität, insbesondere im Zeitfenster der Implantation, zugeschrieben werden.

**Methoden** Es wurde die Expression des Oberflächenrezeptors CD160, der zahlreiche NK-Zell-Funktionen steuert, durchflusszytometrisch auf peripheren und dezidualen NK-Zellen von Frauen nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf bestimmt und miteinander verglichen. Zellen der Zelllinie NK-92 wurden mit HLA-G1s, das einer der möglichen CD160 Liganden ist, sowie IL-15 stimuliert. Parallel wurden die für IL-15 relevanten intrazellulären, gegenseitig antagonistischen Signalmoleküle STAT3 und SOCS3 mittels RNA Interferenz ausgeschaltet und die Einflüsse auf Zytotoxizitäts-assoziierte Proteine untersucht. Dazu wurde die intrazelluläre Expression von GranzymB, Granulysin und Perforin durchflusszytometrisch gemessen.

Auch die Rezeptoren CD56 und CD16, sowie die intrazellulären Moleküle VEGF und IL-6 wurden durchflusszytometrisch bestimmt, um so die Korrelation zu den Hormonen Progesteron, Östradiol und zu einer lokalen Verletzung des Endometriums durch Biopsieentnahme zu ermitteln. Man begann diese Testreihe mit gesunden Eizellspenderinnen. Weiterhin wurde bei Patientinnen, die bereits 3 oder mehr Aborte hatten, Apoptosevorgänge untersucht, indem die Expression von Bcl-2 und Bax immunhistochemisch ermittelt wurde.

**Ergebnisse** Es konnte gezeigt werden, dass deziduale NK-Zellen signifikant mehr CD160 produzieren als periphere NK-Zellen. Dabei wurde der Rezeptor sowohl von CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>+</sup> als auch von CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> NK-Zellen ohne wesentliche Intensitätsunterschiede exprimiert.

Der „Knock-down“ von STAT3 bzw. SOCS3 zeigte keine signifikanten Auswirkungen auf die Expression der Zytotoxizitäts-assoziierten Proteine GranzymB, Granulysin und Perforin. Beim Vergleich von STAT3 und SOCS3 untereinander fällt jedoch nach dem Ausschalten der SOCS3 Proteine eine überwiegend, wenn auch nicht signifikant erhöhte Granulysin-Expression auf, was sich durch die antagonistische Wirkung dieser beiden Moleküle erklären lässt.

Nach Stimulation der Ovarien mit GnRH konnten wir erhöhte Progesteron und VEGF-Konzentrationen feststellen, sowie eine Änderung in dem Verhältnis der NK-Zell - Populationen. Es kam zu einer Abnahme angiogener und zu einer Zunahme zytotoxischer NK-Zellen. Eine lokale Verletzung des Endometriums führte zu einer gesteigerten VEGF Konzentration. Wir konnten einen Zusammenhang von IL-6 mit der Östradiol-Konzentration beobachten, allerdings nicht mit der Konzentration an CD56<sup>bright</sup>-Zellen.

Bei Patientinnen mit mehreren Aborten konnte im Unterschied zur Kontrollgruppe eine verstärkte Aktivität des anti-apoptotischen Bcl-2 - Proteins in den Epithelzellen der uterinen Glandula nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe zeigte dagegen das pro-apoptotische Bax – Molekül eine leicht erhöhte Aktivität. Lichtmikroskopisch gab es in beiden Gruppen keine sichtbaren Unterschiede.

**Schlussfolgerung** Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass NK-Zellen wichtige Funktionen im Verlauf einer Schwangerschaft erfüllen und es nicht nur zu einer Unterdrückung ihrer Zytotoxizität kommt. Fehlregulationen während der Schwangerschaft können mit Fehlfunktionen der dezidualen NK-Zellen einhergehen, indem das

immunologische Gleichgewicht beeinflusst wird oder sie aus einer Fehlfunktion des Immunsystems resultieren.

Zweifelloos bedarf es vieler immunoregulatorischer Feinheiten um einem semiallogenen Föten das reibungslose Heranreifen im mütterlichen Uterus zu gewährleisten. Es ist anzunehmen, dass Fehlregulationen dieses Systems in Zusammenhang mit Problemen der Reproduktion, Schwangerschaftserkrankungen, Aborten oder Präeklampsie stehen, sie bedingen oder daraus resultieren.

## 2. Einleitung

Sterilität, (Prä-)Eklampsie, Molenbildung, sowie Früh- und Fehlgeburten sind weit verbreitete Krankheiten der Gynäkologie und Geburtshilfe und betreffen heutzutage viele Paare und Schwangere. Es sind Komplikationen, die während des Reproduktionsablaufes auftreten und in engem Zusammenhang mit dem Immunsystem stehen, bzw. dort sogar eventuell ihren Ausgang nehmen. Die genaue Ätiologie und Pathogenese hingegen sind wenig bekannt oder zumindest für eine effektive Prävention oder Behandlung unzureichend erforscht. Dazu fehlen bereits die Grundlagen für das Verständnis eines jeden pathologischen Ablaufes, das Wissen um die entsprechende Physiologie.

Wie in keinem anderen Fachgebiet der Medizin ist in der Reproduktionsimmunologie nicht nur die Pathologie, sondern auch die Physiologie bis in unsere Zeit größtenteils ein Rätsel geblieben.

Folgt man den Regeln und den bisherigen Kenntnissen der Immunologie, sollte man annehmen, dass der Fötus als semiallogener Körper im Mutterleib von dessen Immunsystem erkannt und abgestoßen wird. Er ist das Produkt zweier Individuen, die sich in ihren Genen und damit auch in ihren Oberflächenmolekülen, die zur Erkennung des „Selbst“ dienen, unterscheiden. Besonders bei der Implantation der Blastozyste, wenn fetale Trophoblastzellen in mütterliches Gewebe invadieren um die Plazenta zu bilden und die mütterlichen Gefäße auszukleiden (s.u.), kommen Zellen fetalen Ursprungs in direkten Kontakt mit mütterlichen Immunzellen. Dabei kommt es nicht nur zur Toleranz gegenüber diesen Trophoblasten, sondern auch zu einer intensiven Kommunikation zwischen beiden Komponenten, die besonders im ersten Schwangerschaftstrimenon Bedeutung hat:

Trophoblastzellen stellen als Grenzschicht zwischen mütterlichem und kindlichem Gewebe eine wichtige Funktion für den gegenseitigen Stoffaustausch dar und werden durch das Immunsystem der Mutter kontrolliert und mit Hilfe von Hormonen und Zytokinen gesteuert. Die Feinregulation dieser Interaktion erscheint von wesentlicher Bedeutung, da sowohl eine mangelnde Invasion der Trophoblasten als auch deren unkontrollierte Proliferation zu Komplikationen der Plazentation über Molenbildungen bis hin zum Absterben der Frucht führen kann.



Zu dem Phänomen der Immunität des semiallogenen Föten gegenüber der mütterlichen Immunabwehr, gibt es verschiedene Erklärungsansätze, von denen allerdings keiner hinreichend zufriedenstellend und allgemein anerkannt ist.

Mittlerweile wird in diesem Zusammenhang vor allem eine Zellpopulation stark erforscht, die nicht nur im Hinblick auf die Immunsuppression interessante Charakteristika aufweist, sondern auch eine Funktion in der Regulierung der Trophoblasteninvasion zu haben scheint.

Diese Natürlichen Killerzellen stellen den Hauptfokus dieser Arbeit dar und werden in ihren Funktionen unter verschiedenen Aspekten behandelt.

## **2.1 Grundprinzipien des Immunsystems**

Tagtäglich bedrohen unseren Organismus sowohl exogene Pathogene als auch körpereigene, entartete Zellen. Dafür hat sich im Laufe der Evolution ein ausgeklügeltes Abwehrsystem entwickelt, das in seiner Komplexität den Körper von den meisten Gefahren verschont. Dieses Immunsystem, bestehend aus zahlreichen Zelltypen und Molekülen, nützt vielerlei Interaktionen um das immunologische Gleichgewicht zu bewahren. Eine Störung dieses Gleichgewichts kann weit reichende Folgen haben und in einer Schwangerschaft bis zu einem Absterben der Frucht führen. (Markert UR 2005)

### **2.1.1 Angeborene und erworbene Immunabwehr**

Eine grundlegende Unterteilung des Immunsystems erfolgt in einen angeborenen oder unspezifischen Teil und einen wesentlich jüngeren Teil, die erworbene oder spezifische Immunabwehr. Während ersterer rund 90 Prozent der Krankheitserreger bewältigen kann und eine erste Barriere für diese darstellt, kann die adaptive Immunabwehr sich an spezifische Antigene anpassen und so effizienter reagieren. Letzten Endes ist es das Zusammenspiel beider, das einen wirkungsvollen Schutz bietet. (Borghans et al. 1999)

Dem angeborenen Immunsystem gehören unter anderen das Komplementsystem, sowie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Natürliche Killerzellen an. Die Wirkungsmechanismen sind vielfältig. So können einige auf einen bakteriellen Reiz hin eine Entzündungsreaktion auslösen, andere hingegen vermögen mit speziellen externen und intrazellulären Rezeptoren, wie zum Beispiel den TLRs (Toll-like receptors) und RLHs

(retinoic-acid inducible gene I-like helicases), Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) zu erkennen und so die Erreger zu bekämpfen. (Takeuchi et al. 2007)

Der Unterscheidung von körpereigenen Zellen dienen MHC-Moleküle (siehe Kapitel 2.6), die sie als solche kennzeichnen und vor der angeborenen Immunabwehr schützen.

Zu der spezifischen Immunabwehr zählt man vor allem Antigenpräsentierende Zellen, sowie B- und T-Lymphozyten. Es reagiert mit seinen ursprünglich naiven Zellen auf einen Reiz des angeborenen Immunsystems mit der Bildung von spezifischen Gedächtniszellen. Kommt es zu einer zweiten Immunreaktion, sind diese schneller verfügbar und die Erreger können effizienter bekämpft werden. Dabei kann es auch zu Kreuzreaktionen mit körpereigenen Antigenen kommen. Um diese gering zu halten und dennoch ein breites Spektrum an pathogenen Antigenen zu erkennen, erfordert es ein großes Repertoire an Spezifität. (Borghans et al. 1999)

### 2.1.2 Die zellulären und humoralen Bestandteile

Wie die angeborene und die erworbene Immunabwehr eng miteinander verwoben sind, so ergänzen sich auch die zellulären und humoralen Bestandteile der Immunabwehr und interagieren miteinander.

#### Die zellulären Bestandteile

Leukozyten sind die Zellen des Immunsystems, die mit Phagozytose, Antigen-Opsonierung, Zytokin- und Proteasen-Ausschüttung zur Immunabwehr beitragen. Sie werden in Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten unterteilt. Zu letzteren werden wiederum B- und T-Zellen, als auch die Natürlichen Killerzellen gezählt.

Im peripheren Blut sind sie in ihrer Anzahl etwa wie folgt vertreten (Berrington et al. 2005):

70% Granulozyten

20% Lymphozyten

10-15% NK-Zellen

1% Monozyten

Wir interessieren uns hier vor allem für die Lymphozyten und NK-Zellen, die während der Schwangerschaft noch weitere Funktionen zu haben scheinen.

Den Hauptteil der Lymphozyten bilden mit rund 70% die T-Zellen, unterteilt in  $CD4^+$  T-Helferzellen (50%) und zytotoxische  $CD8^+$  T-Zellen (20%). (Pathak S, Palan U 2005)

Zusammen mit den B-Zellen entwickeln sich die T-Zellen aus lymphatischen Vorläuferzellen, die aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervorgehen. Die weitere Entwicklung erfolgt im Thymus, wo durch positive und negative Selektion sicher gestellt wird, dass die reifen T-Zellen nur durch Fremddantigene aktiviert werden, die von körpereigenen HLA- Molekülen präsentiert werden. Durch eine solche Aktivierung mittels Antigen präsentierender Zellen differenzieren die  $CD4^+$  Zellen (über MHC I) zu T-Helferzellen und die  $CD8^+$  Zellen (über MHC II) zu cytotoxischen T-Zellen. Dies wird über eine intrazelluläre IL-2 Produktion vermittelt, welche die T-Zelle autokrin zur Proliferation und klonalen Expansion anregt. (Holländer GA. 2006)

Je nach dem, welche antigenpräsentierende Zelle den ersten Kontakt für die T-Helferzelle darstellt, kann sich diese zu TH1 oder TH2 Zellen weiterentwickeln, die sich in ihren Zytokinprofilen unterscheiden. Während TH1 Helferzellen mit der Produktion von IL-2, TNF und IFN- $\gamma$  die zellvermittelte Immunität und die Entwicklung der zytotoxischen T-Zellen fördern, sezernieren TH2 Helferzellen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und stimulieren somit die B-Zellen zur Antikörperproduktion. Beide hemmen sich gegenseitig in ihrer Entwicklung: IL-10 unterdrückt die TH1-Entstehung, während IFN- $\gamma$  der TH2-Bildung entgegenwirkt. (Wegmann et al. 1993)

Die T-Zell vermittelte Zytotoxizität basiert auf der Erkennung von cytosolischen Pathogenen durch den T-Zell Rezeptorkomplex und den CD8-Corezeptor. Dies hat die Ausschüttung von Granula Inhalten, wie den Granzymen und dem Perforin-1 zur Folge. Diese Cytotoxine führen in der Zielzelle zur Apoptose; auf den genauen Mechanismus wird in Abschnitt 2.7.3 eingegangen. (Holländer GA. 2006)

Etwa 20% der peripheren Leukozyten sind B-Zellen. Sie werden im Knochenmark gebildet und durchlaufen in der Milz weitere Reifungsstadien. Am Ende besitzt jede B-Zelle, die im Laufe ihrer Entwicklung keine körpereigenen Antigene erkannt hat (negative Selektion), einen B-Zellrezeptor, der ein spezifisches Antigen in seiner nativen Form erkennt und aufnimmt. Nachdem Bruchstücke dieses Antigens auf dem MHC-II Rezeptor präsentiert wurden, können T-Zellen, die der MHC-Restriktion unterliegen, damit aktiviert werden und durch Zytokinausschüttung die B-Zelle in ihrer Umwandlung zur Plasmazelle oder Gedächtniszelle unterstützen. Plasmazellen sind proliferierte B-Zellen, die Antikörper produzieren und damit eine Verbindung zur humoralen Immunabwehr darstellen. (Janeway 2002)

Die NK-Zellen werden in Kapitel 2.7 noch gesondert behandelt.

## Die humoralen Bestandteile

Die humoralen Bestandteile zirkulieren passiv in den Körperflüssigkeiten. Eine aktive Wanderung an den Ort der Infektion ist ihnen nicht möglich. Sie umfassen Antikörper, Komplementsystem und Interleukine, die als Botenstoffe der Immunzellen wirken und für Wachstum, Reifung und deren Aktivierung sorgen. (Janeway 2002)

Antikörper bestehen aus zwei leichten L-Ketten und zwei schweren H-Ketten. Sie werden von aktivierten B-Zellen, den Plasmazellen, sezerniert und binden ein spezifisches, natives Antigen. Dieser Komplex kann daraufhin phagozytiert werden oder die Komplementkaskade auslösen. Dabei aktivieren Proteine durch proteolytische Spaltung weitere Proteasen bis durch die Reaktionen und Aneinanderreihung dieser Faktoren ein sogenannter Membranangriffskomplex entsteht, der Pathogene durch Porenbildung der Zellmembran lysiert. Weiterhin dient das Komplementsystem der Opsonierung von Mikroorganismen, der Chemotaxis von Immunzellen und löst zudem Entzündungsreaktionen aus. Diese stark zellzerstörenden Eigenschaften machen eine genaue Regulierung des Komplementsystems notwendig. (Janeway 2002)

## 2.2 Die Reproduktion

Nach der Befruchtung der Eizelle kommt es im Durchschnitt nach 267 Tagen zur Geburt – falls keine pathologischen Einflüsse dies verhindern. Dabei kann die Schwangerschaft in Trimester zu je 13 Wochen unterteilt werden. Unter immunologischen Gesichtspunkten ist besonders das erste Trimester von Interesse und es ist auch dieses, in dem sich die meisten Fehlgeburten ereignen. (Chavatte-Palmer et al. 2007)

### 2.2.1 Entwicklung des Embryo: Implantation und Plazentation

Fünf bis sieben Tage nach der Befruchtung kommt es zur Einnistung der Blastozyste, d.h. die embryonalen Zellen haften sich an die Gebärmutterwand an und beginnen diese bis zum Myometrium zu durchdringen (siehe Abb.1). Voraussetzung dafür ist eine hormonbedingt aufgelockerte Gebärmutterschleimhaut und eine enzymatische Lyse der Zona Pellucida durch Proteasen von Embryo und Uterus (Chavatte-Palmer et al. 2007).

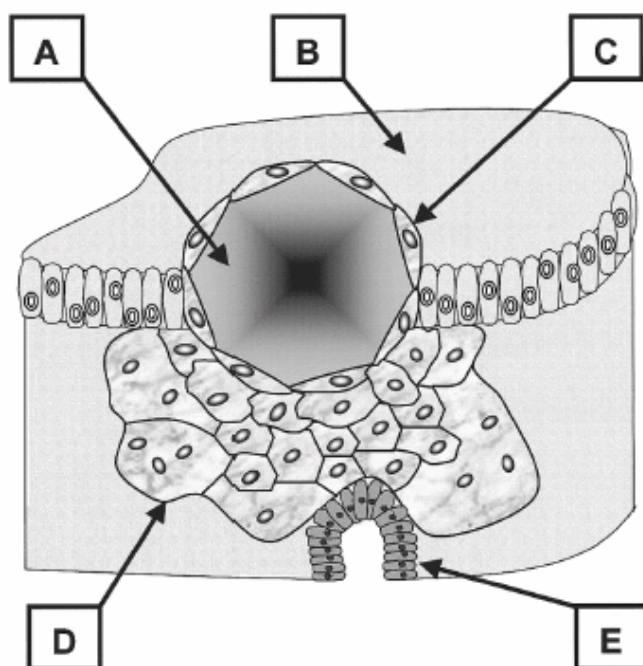
Durch diese Kontaktaufnahme der kindlichen Zellen wandelt sich der entsprechende Teil des mütterlichen Gewebes in fett- und glykogenhaltige Stromazellen um und wird dann als

Dezidua bezeichnet. Der Umbau dieses Gewebes erfordert zunächst den Abbau, wodurch die heterotrophe Ernährung der Frucht gewährleistet wird. (Stauber M und Weyerstahl T 2005)

Bei der Anlagerung an das Endometrium hat sich aus dem Embryoblasten bereits das Trophektoderm entwickelt, das später die Plazenta bildet. Am achten Tag kann man bereits zwischen inneren Zytotrophoblasten und äußeren Syncytiotrophoblasten unterscheiden; letztere kennzeichnen sich durch fehlende Zellgrenzen und Verschmelzung aus, wodurch Vakuolen entstehen (siehe Abb.1). Diese Trophoblasten formen Primärzotten; sobald sie embryonales Mesoderm enthalten werden sie Sekundärzotten genannt und die endgültigen Tertiärzotten zeichnen sich durch Einwandern von kindlichen Gefäßen aus. (Stauber M und Weyerstahl T 2005)

Zusätzlich gibt es Trophoblasten, die sich von diesem Gewebeverbund lösen, invasiv in das mütterliche Gewebe eindringen und zum Teil dessen Gefäßendothel ersetzen. Dadurch kann mütterliches Blut in die zuvor gebildeten Lakunen fließen, die Zotten umspülen und so den Foetus hämatotroph ernähren. Neben ihrer ernährenden Funktion erfüllt die Plazenta ebenfalls eine wichtige Rolle in der Hormonproduktion, wodurch auch immunologische Prozesse gesteuert werden und eine aktive Wanderung von mütterlichen Immunzellen in das plazentare Gewebe stattfindet. (Stauber M und Weyerstahl T 2005)

Demnach hat die Plazenta einen mütterlichen und einen kindlichen Anteil, die in engem Kontakt miteinander stehen. Interessant für uns ist die Interaktion zwischen den Immunzellen mütterlicherseits und den Trophoblasten des Embryos, die semiallogenes Gewebe bilden. (Stauber M und Weyerstahl T 2005)



**Abb.1: Schematische Darstellung eines Embryos (A) während der Implantation und seiner Grenzfläche mit dem Endometrium (B). Zytotrophoblast (C) und Syncytiotrophoblast (D) stammen vom Embryo und sind der Mutter halb fremd. Beide befinden sich in nächster Nähe zu den mütterlichen Blutgefäßen (E) und haben daher engen Kontakt zu dem mütterlichen Immunsystem.**

## 2.2.2 Immunologie der Plazenta

Der uteroplazentare Kreislauf (s.o.) dient zur Versorgung des Foeten mit Sauerstoff und Nährstoffen. Gleichzeitig können Ausscheidungsprodukte des Föten über diesen Kreislauf abtransportiert werden. Das geschieht ohne dass sich kindliches und mütterliches Blut durchmischen, wodurch abstoßende Immunreaktionen verhindert werden. (Stauber M und Weyerstahl T 2005)

Trotzdem existiert eine feto-maternale Grenzfläche. An drei Stellen in der Plazenta haben fetale Trophoblastzellen direkten Kontakt zu mütterlichen Immunzellen (in Abbildung 2 farbig markiert) (Markert 2005):

1. Im Bereich der Zotten wird der äußere Syncytiotrophoblast von mütterlichem Blut umspült.
2. Extravillöse Trophoblastzellen dringen in das deziduale Stromagewebe ein, wo ebenfalls mütterliche Immunzellen eingewandert sind.
3. Trophoblastzellen, die das mütterliche Endothel ersetzen, haben Kontakt zu mütterlichem Blut.

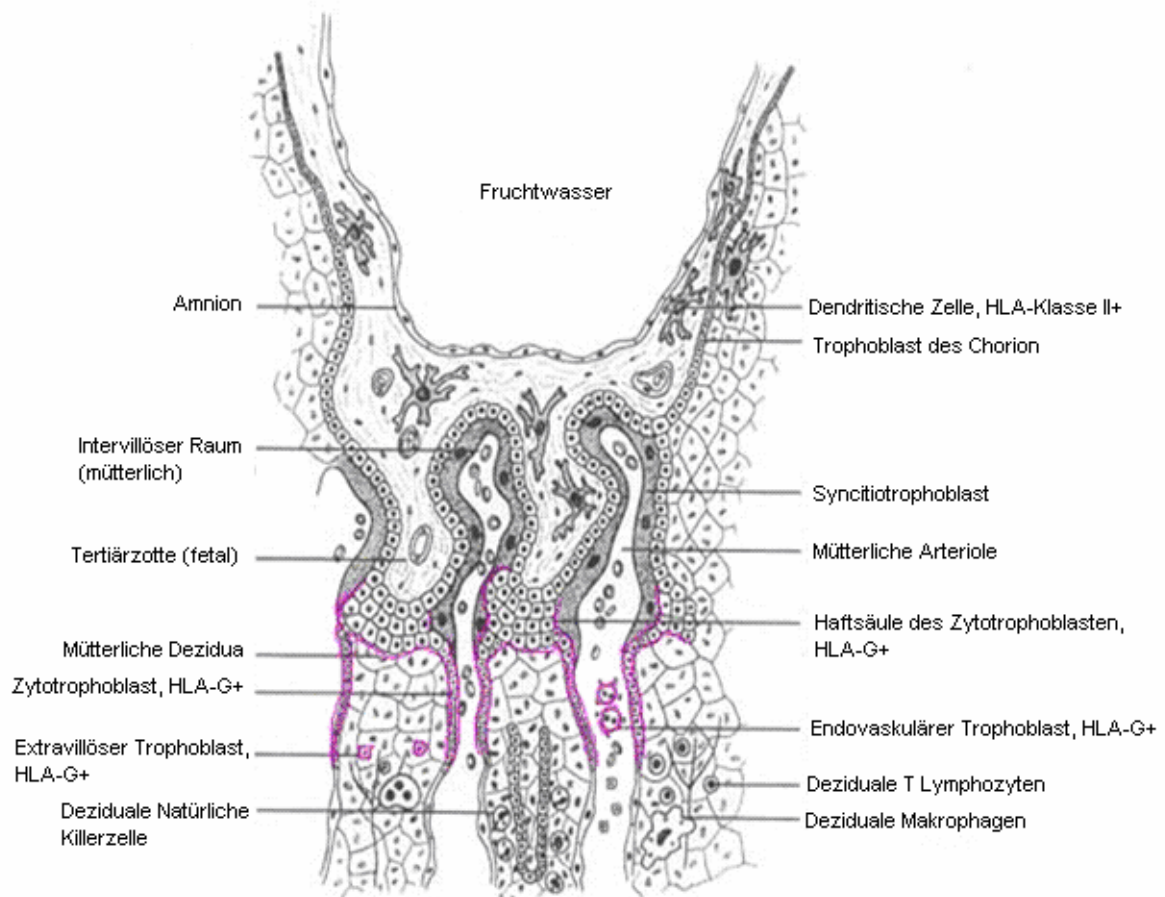


Abbildung 2: Darstellung der Kompartimente, Zelltypen und Antigenexpression der Plazenta



Dass es dabei nicht zu Immunreaktionen kommt, erfordert einige Besonderheiten des plazentaren Gewebes und seinen Immunzellen, sowie deren exakte Feinregulation. (Markert 2005)

Trophoblastzellen weisen bezüglich ihrer HLA-Expression eine Eigenart auf: HLA-A und -B Gene sind herunterreguliert, während man das nicht-klassische HLA-G auf extravillösen Zytotrophoblasten, fetalen Endothelzellen, sowie auf Chorionvilli und Amnionzellen exprimiert findet. Dadurch entgehen sie möglicherweise einer zytotoxischen NK- und T-Zelllyse. (Szekeres-Bartho 2002, Koc S et al. 2003)

Verglichen mit dem peripheren Blut findet sich in der Plazenta außerdem eine spezielle Leukozyten-Verteilung (Berrington et al. 2005, Moffett-King A 2002, De M et al. 1991):

<u>Leukozyten</u>	<u>Peripheres Blut</u>	<u>Plazenta</u>
NK-Zellen	10-15%	70-80%
Lymphozyten	20-40%	10-15%
Monozyten/Makrophagen	1%	15-20%
Granulozyten	40-70%	5%

Im Vergleich zu der Leukozyten-Verteilung im peripheren Blut fällt auf, dass Makrophagen und NK-Zellen in ihrem Verhältnis stark zunehmen, während Granulozyten, die den Hauptbestandteil der Leukozyten im peripheren Blut ausmachen, enorm abnehmen. Hinzu kommt, dass sich die mengenmäßig am stärksten vertretenen Leukozyten, die NK-Zellen, in ihrer Morphologie wesentlich von den peripheren NK-Zellen unterscheiden. Dies führt zu der Annahme, dass auch die Funktionen dieser Zellen andere sind, als wir sie normalerweise von Immunzellen erwarten würden. Verständlich wird das mit dem Hintergrund, dass die Aufgabe des Immunsystems, fremde und veränderte Zellen zu beseitigen, in der Plazenta eher eine untergeordnete Rolle spielt, bzw. auch kontraproduktiv sein kann.

Während die B-Zellen der Plazenta in ihrer Anzahl und Funktion unwesentlich erscheinen, kann man für die CD8<sup>+</sup> T-Zellen mehr Bedeutung vermuten:

Mehr als zwei Drittel aller T-Zellen in der Dezidua sind zytotoxisch (Vince 2000), während im peripheren Blut die T-Helferzellen deutlich überwiegen.

Zytotoxische T- und NK-Zellen scheinen für apoptotische Vorgänge in der Plazenta eine Rolle zu spielen.

### 2.2.3 Funktion der Apoptose

Apoptose als programmierter Zelltod ist ein wichtiger Bestandteil einer physiologisch verlaufenden Schwangerschaft. Besonders für die Implantation der Blastozyste in das reife Endometrium und die dafür notwendigen Umbauvorgänge erfüllt sie eine wesentliche Rolle. Sie beseitigt überflüssige und geschädigte Zellen und erhält damit die Homeostase (s.o.). Kontrovers diskutiert wird die Rolle zur Elimination zytotoxischer Immunzellen, wie der CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>+</sup> Zellen und damit die dadurch mögliche Unterdrückung des mütterlichen Immunsystems. (Kopcow et al. 2005, Ohshima et al. 2001)

Daneben ist die Apoptose in pathologischen Situationen notwendig, um unkontrolliertes Zellwachstum zu regulieren (Halperin et al. 2000). Eine strenge Kontrolle ist unabdingbar, auch um eine Schädigung des Nachbargewebes zu verhindern.

Bei der Apoptose kommt es über einen extrinsischen oder intrinsischen Weg zu zellinternen Signalen, die eine Kaskade mit Caspasen-Aktivierungen auslöst. Die proapoptotischen Bax- oder antiapoptotischen Bcl-2 Moleküle sind wichtige Apoptosemarker. Sie wirken über die Regulierung der Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c. (Heibein AJ 2000)

Weitere Faktoren, die die Apoptose in den Stromazellen des Endometriums induzieren, sind Progesteron, IL-15 und IL-2 über Perforin und Granzym Expression, sowie das Fas-Molekül (CD95), das auf NK-Zellen exprimiert wird und an den Fas-Liganden der Zielzelle bindet. Dieser wird u.a. auf Trophoblasten exprimiert. (Crncic et al. 2007)

## 2.3 Das TH1 – TH2 Gleichgewicht

Wie zuvor beschrieben (s.o.) exprimieren T-Helferzellen unterschiedliche Zytokine und werden demnach in TH1- und TH2-Helferzellen unterteilt. Während das TH1–Repertoire LIF, IL-2, -12, -15, -18, TNF $\alpha$  und INF $\gamma$  umfasst und damit vor allem die zellvermittelte Immunität unterstützt, zählt man IL-4, -5, -10 und IL-13 zu den TH2 sezernierten Zytokinen, die die Entwicklung der B-Zellen mit der humoralen Immunität fördern. (Kanai T et al. 2001)

Bereits in den 90er Jahren sprach man von einem TH1/TH2 Paradigma. Tom Wegmann postulierte 1993: „successfull pregnancy as a TH2 phenomenon“ (Wegmann et al. 1993). Die Annahme gründete sich auf eine Reihe von Experimenten, denen zu Folge TH1 Zytokine zu einem Absterben der Frucht führen, während sich TH2 Zytokine günstig auf das Überleben des Föten auswirken. Das wurde darauf zurückgeführt, dass die Antikörperantwort der humoralen Immunität in der fetoplazentaren Einheit besser toleriert werden kann. Anti-fetale



Antikörper werden durch die Plazenta abgepuffert, wohingegen der Fötus nur schwer vor der zellvermittelten Immunität zu schützen ist. Andererseits können Antikörper gegen Pathogene die Plazentaschranke passieren und so den Föten, dessen Immunsystem noch nicht entwickelt ist, vor Infektionen schützen. Das hat zur Folge, dass ein relativ guter Schutz gegen Infektionen, wie z.B. Leishmanias, Toxoplasmose, etc., die über die humorale Immunantwort bekämpft werden, besteht, während Krankheiten wie AIDS, Tuberkulose, etc., für deren Bekämpfung eine zellvermittelte Immunität notwendig ist, persistieren. Man kam zu der Hypothese, dass das TH2 Zytokinprofil der Trophoblasten die Bildung der mütterlichen TH1 Zytokine supprimiert und dadurch das Gleichgewicht in Richtung der TH2 Zytokine verschiebt. Tatsächlich hemmt das TH2 Zytokin IL-10 die Synthese der TH1-Zellen, wodurch wiederum weniger IFN- $\gamma$  vorhanden ist, um der Proliferation der TH2-Zellen entgegen zu wirken. (Wegmann et al. 1993)

Die Erkenntnis, dass ein verstärktes TH1 Zytokinprofil mit Fehlgeburten verbunden ist, klärt dabei noch nicht das Verhältnis von Ursache und Wirkung. Die Annahme, eine TH1 gewichtete Immunität führe zur Abstoßung des Föten, wurde bald widerlegt: das TH1/TH2 Gleichgewicht, vor den klinischen Zeichen einer Fehlgeburt gemessen, ist kein Indiz für eine später folgende Fehlgeburt (Bates et al. 2002). Dagegen wurde nach der Diagnosestellung einer Fehlgeburt eine TH1-Verlagerung festgestellt, was dafür spricht, dass diese eher als Folge anstatt als Ursache eines Abortes anzusehen ist (Christiansen et al. 2005).

Kritisiert wird heutzutage weiterhin, dass das TH1/TH2 Paradigma eine zu vereinfachte Sichtweise darstellt. So gibt es viele verschiedene Gründe, die zu Aborten führen können (Chromosomenanomalien, etc.) und nicht mit einem abnormen Zytokinprofil in Zusammenhang stehen. (Michimata et al. 2003)

Es darf außerdem nicht vergessen werden, dass in einer regelrecht verlaufenden Schwangerschaft das verstärkte TH2 Zytokinprofil erst nach erfolgter Implantation auftritt. Für die Implantation selbst sind durchaus auch inflammatorische Moleküle und Zellen von Bedeutung. (Chaouat 2007)

Inzwischen hat man auch einige Zytokine gefunden, die nicht in dieses Schema passen (LIF, CMF, IL-6). Dabei nimmt IL-6 eine Sonderstellung ein, da es für die Verlagerung in Richtung des TH2 Zytokinprofils verantwortlich gemacht wird. (Margni und Zenclussen 2001)

## 2.4 Hormone, Wachstumsfaktoren und Cytokine

Die Kommunikation zur Regulierung der Immunreaktionen wird u.a. von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen gewährleistet. (Chan et al. 2004, Margni und Zenclussen 2001)

Bereits in den 70er Jahren waren viele dieser Moleküle bekannt, die in ihrer Struktur und Funktion oft erst Jahre später erforscht werden konnten. Mit ihrer hohen Affinität zu spezifischen Rezeptoren zeichnen sich die Zytokine durch ihre enorme Wirksamkeit in geringsten Konzentrationen aus (1 milliardstel Gramm pro Milliliter). Ihre autokrine und parakrine Wirkweise umfasst Differenzierung, Aktivierung, Gewebeerstörung und Regulation. Je nach Zielzelle entfalten sie positive oder negative Wirkung (Pleiotropismus); ihre Multifunktionalität bedingt die häufig redundanten Wirkungen. (Akira et al. 1990, Nathan et al. 1991)

Im Folgenden sind die hier relevanten Hormone, Wachstumsfaktoren und Cytokine in ihrer Funktion zusammengefasst.

*Östrogen* Östrogen bewirkt im Uterus ein erhöhtes Vorkommen von Makrophagen und Neutrophilen. Dadurch hat es einen proinflammatorischen Effekt.

Zusammen mit Progesteron induziert es die Differenzierung der Stromazellen des Endometriums um die Dezidua zu bilden und die Einnistung der Blastozyste vorzubereiten. (Stauber M und Weyerstahl T 2005)

*Progesteron* Als wichtigstes Hormon der sekretorischen Phase induziert es die Apoptose in den Stromazellen des Endometriums und bereitet das Gewebe für die Implantation vor. Während Östrogen wie zuvor beschrieben, eine proinflammatorische Wirkung hat, wird diese durch Progesteron antagonisiert. Die Mechanismen dieser Immunsuppression sind allerdings noch unklar. (Tibbetts et al. 1999)

Über direkte oder indirekte (PIBF, TH2 Zytokine) Interaktion mit peripheren NK-Zellen hemmt es diese während der Schwangerschaft in ihrer Anzahl, Aktivierung und Zytotoxizität. Dagegen wird die Proliferation, Differenzierung und Zytokinproduktion der uterinen NK-Zellen, sowie deren Homing in das Endometrium unterstützt. Das geschieht direkt oder über Induktion von VEGF, Prolaktin, IL-15 und anderer Faktoren. (Dosiou et al. 2005)

*hCG* Dieses Schwangerschaftshormon wird von Trophoblastzellen nach einer Stimulation mit CSF-1 produziert, das speziell von dezidualen NK-Zellen exprimiert wird. Neben seiner bekannten Funktion zum Erhalt des Corpus Luteum spielt es bei der Trophoblasteninvasion und der Vaskularisierung des Endometriums eine Rolle. (Staun-Ram und Shalev 2005)

*IL-2* IL-2 führt zur Proliferation und Differenzierung von B- und T-Zellen und trägt zudem zur Freisetzung von Zytokinen aus T-Zellen bei.

Es ist das Zytokin für die NK-Zell Aktivierung und verantwortlich für deren Zytotoxizität. Da es allerdings normalerweise in der Decidua nicht vorkommt, beschränkt sich die Wirkung in vivo auf periphere NK-Zellen. Trotzdem kann auch bei dezidualen NK-Zellkulturen nach Zugabe von IL-2 eine Zytotoxizität gegenüber der K562-Zelllinie festgestellt werden (Poehlmann et al. 2006).

*IL-6* IL-6 hat durch Stimulierung vieler Immunzellen zentrale Aufgaben in der immunologischen Abwehr:

- Induktion der Differenzierung von B-Zellen in Antikörper produzierende Plasmazellen
- Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen aus Hepatozyten
- zusammen mit IL-1 Wirkung auf die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Helferzellen
- zusammen mit IL-2 Wirkung auf die Teilung und Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen

Dabei entfaltet es seine Wirkung in den verschiedenen Zellen unterschiedlich schnell (zwischen 5 und 48 Stunden), was die verschiedenen Phasen der Entzündungsreaktion erklären kann. (Kameda et al. 1990)

Dieses Zytokin wird sehr kontrovers diskutiert, da es weder der TH1- noch der TH2-Klasse eindeutig zuzuordnen ist, wobei ihm hauptsächlich inflammatorische Funktionen zugeschrieben werden. Neuerdings werden auch antiinflammatorische Effekte auf die Wirkung dieses Zytokins zurückgeführt und es wird eine wichtige Bedeutung für das TH1/TH2 Gleichgewicht diskutiert. Möglicherweise ist es für die Balance zwischen beiden verantwortlich, bzw. für die Umgewichtung vom proinflammatorischen TH1-Fenster zu den inflammatorischen TH2-Zytokinen. (Dubinsky et al. 2008)

Es wird von Immunzellen sowie Stromazellen gebildet und wird in der Plazenta hauptsächlich von Syncytiotrophoblasten produziert. (Kameda et al. 1990)

*IL-10* IL-10 ist ein antiinflammatorisches TH2-Zytokin, das TH1 vermittelten Entzündungsreaktionen an der fetoplazentaren Einheit entgegenwirkt. Es wird neben Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten auch von dezidualen NK-Zellen produziert. Im peripheren Blut hemmt es die Zytokinproduktion und fördert Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten. (Murray 2005)

*IL-15* Gebildet wird es von Stromazellen des Endometriums vor allem unter Progesteroneinfluss. IL-15 aktiviert deziduale NK-Zellen, ähnlich wie IL-2 periphere NK-Zellen aktiviert. Dadurch wird ihm eine wichtige Rolle in der NK-Zell-Proliferation und -Reifung zugesprochen. (Markert 2005)

*LIF* LIF ist für eine erfolgreiche Implantation unverzichtbar, wie mehrere Versuche mit Mäusen zeigten. Es fördert das Wachstum von Stromazellen des Endometriums und wird als proinflammatorisches Zytokin zusammen mit IL-10 bei Verletzungen sezerniert. Es teilt viele biologische Funktionen mit dem IL-6. (Sharkey AM 1999)

*VEGF* Stromazellen des Endometriums produzieren sowohl VEGF (vascular endothelial growth factor) als auch den entsprechenden Rezeptor dafür. Progesteron ist der Stimulus und die Wirkungen sind wesentlich für eine erfolgreiche Plazentation und Vaskularisierung. Neben der Angiogenese wird durch eine Erhöhung der Gewebespermeabilität NK-Zellen das Einwandern in die Dezidua erleichtert und deren Umdifferenzierung in den regulatorischen, dezidualen Typ unterstützt. (Walter et al. 2005)

*TNF- $\alpha$*  Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, das die Bildung von Zytokinen induziert, Phagozytose und Zytotoxizität bei Monozyten, Makrophagen und Granulozyten steigert und zu Nekrosen in Tumoren führt. TNF- $\alpha$  kann die DNS-Synthese in Trophoblastzelllinien hemmen und wird gleichfalls von diesen sezerniert. Seine mRNA wurde zudem sowohl in decidualen als auch in peripheren Natürlichen Killerzellen nachgewiesen. Zusammen mit IL-1 aktiviert es antigenstimulierte T-Zellen und reguliert die Antikörperproduktion, führt aber auch zu strukturellen und funktionellen Änderungen des Endothels, die letztlich zu Thrombosen und Vasokonstriktion führen können. (Elenkov 2001)

*TGF- $\beta$*  Der Transforming Growth Factor- $\beta$  hemmt die Differenzierung von B-Lymphozyten und die Proliferation von B- und T- Lymphozyten sowie verschiedene Zytokinwirkungen und Wachstumsfaktoren mit mitogener Wirkung. Es wird von dezidualen Stromazellen, T-Zellen und Makrophagen sezerniert. Durch die Induktion von Gewebeinhibitoren von Metalloproteinasen unterdrückt TGF- $\beta$  die Trophoblasteninvasion. (Staun-Ram und Shalev 2005)

*IFN- $\gamma$*  Interferon- $\gamma$  wird u.a. von aktivierten T-Zellen, virusinfizierten Zellen und NK-Zellen sezerniert, wirkt antitumorös, antiviral, hemmend auf die Zellproliferation und triggert die zellvermittelte Immunität. Seine immunregulative Wirkung entfaltet es auch in der Dezidua, indem es in physiologischen Konzentrationen die uterinen NK Zellen aktiviert und so eine schützende Funktion für die Trophoblastzellen hat. In hohen Konzentrationen und inflammatorischer Umgebung kann es auch toxisch wirken. Als inflammatorisches TH1-Zytokin wird es im Zeitfenster der Implantation von IL-18 stimuliert. (Ledee et al. 2007)

Neben seiner Bedeutung für die Vaskularisierung in Mausplazenten, schützt IFN- $\gamma$  die menschlichen Trophoblastzellen vor zytotoxischen NK-Zellen. Dies dürfte in der Regel allerdings keine große Rolle spielen, da deziduale NK-Zellen für ihre Aktivierung IL-2 benötigen, das man normalerweise nicht in der Dezidua vorfindet. (Ledee et al. 2007)

## 2.5 Signaltransduktionswege und deren Hemmung

Da das mütterliche Immunsystem und insbesondere die NK-Zellen eine potenzielle Gefahr für den Foetus darstellen, müssen Immunantwort, Funktion und Wachstum der dezidualen Zellen genau reguliert werden. Dazu dienen häufig Zytokine, deren Wirkung über verschiedene Signaltransduktionswege an die Zelle weitergeleitet wird. Daneben gibt es Mechanismen, die diese Zytokinsignale kontrollieren.

Zu den wichtigsten gehört der JAK/STAT-Weg, wobei STAT3 (Signal Transducer and Activators of Transcription) mit der Zellzykluskontrolle, der Regulierung der Apoptose und der Zelldifferenzierung eine essentielle Funktion für die frühe Embryonalentwicklung zugesprochen wird (Poehlmann et al. 2005). Er ist Hauptmediator der Signaltransduktion von Zytokinen der IL-2-, IL-6- und IL-10-Familien (Levy et al. 2002) und wird u.a. über eine negative Rückkopplungsschleife der SOCS (Suppressors of Cytokine Signaling) -Proteine inhibiert. (Wormald et al. 2004). Stimuliert wird das STAT3 Molekül über phosphorylierte

Jak (Janus-Familie-Kinasen) -Proteine, die die STATs rekrutieren, so dass diese als Dimere in den Zellkern wandern und die Transkription der entsprechenden Zielgene induzieren (siehe Abb.3). Die Jak-Proteine sind Rezeptor assoziierte Tyrosinkinasen, die sich nach Oligomerisierung der Zytokinrezeptoren gegenseitig phosphorylieren und aktivieren. (Neumann 2008)

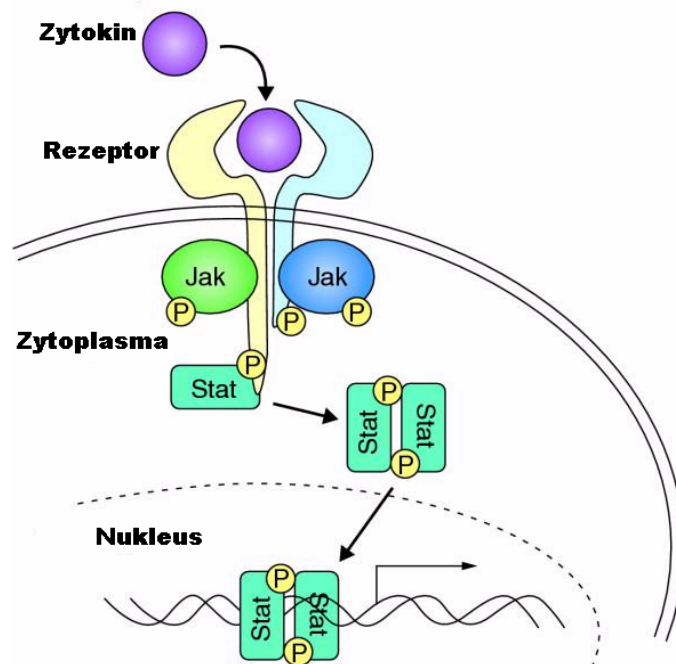


Abbildung 3: **Der JAK/STAT Signalweg.**

Bisher ist noch wenig über die JAK/STAT – Signaltransduktion in dezipualen Lymphozyten während der Schwangerschaft bekannt. Eine Bedeutung des JAK/STAT – Systems bei der Balance zwischen Th1- und Th2-Zytokinen, sowie bei der Aktivierung der NK-Zellen über IL-2 und IL-15 Rezeptoren wird angenommen. ( Poehlmann et al. 2006)

Bekannt ist auch, dass eine Aktivierung von STAT3, bzw. entsprechend die Unterdrückung der SOCS3 Expression zu einer verstärkten zytotoxischen Aktivität in NK-Zellen führt. (Braunschweig 2007)

## 2.6 Die MHC-Moleküle

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC), beim Menschen auch HLA (humanes leukozytenassoziertes Antigen) genannt, umfasst rund 3.5Mb und ist auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert. Man kann drei Gruppen unterscheiden, die MHC Klassen I und II, sowie die Gene der Klasse III, die unter anderem für Proteine der Komplementkaskade kodieren. (Holländer 2006)

### 2.6.1 Die MHC-Klassen I und II

Beide tragen zur Antigenerkennung von T-Lymphozyten bei (MHC-Restriktion, s.o.).

MHC Klasse II Moleküle werden von immunregulierenden Zellen exprimiert: Makrophagen, Antigen-präsentierenden Zellen (APC), B-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten. Sie präsentieren Bruchstücke von extrazellulären Antigenen, wie z.B. Bakterien, und binden an den CD4 Rezeptor von T-Helferzellen, die dadurch aktiviert werden (s.o.). (Holländer 2006)

MHC-Klasse I Moleküle können in die klassischen HLA-A-, -B- und -C- Formen, sowie in die nicht-klassischen HLA-E, -F und -G Subtypen unterteilt werden. Sie besitzen im Allgemeinen eine  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  Domäne, die nicht-kovalent an  $\beta 2$ -Mikroglobulin gebunden sind (Le Gal et al. 1999).

Die klassischen Formen findet man auf fast allen kernhaltigen somatischen Zellen. Sie präsentieren zelleigene Moleküle, aber auch intrazelluläre Pathogene. Damit können zytotoxische T-Lymphozyten mit ihrem CD8-Rezeptor viral oder tumorös befallene Zellen erkennen und es kommt nachfolgend zu einer Zellyse. (Holländer 2006)

Der starke Polymorphismus dieser nicht-klassischen Formen hat Bedeutung für die Interaktion mit Natürlichen Killerzellen. Diese erkennen körpereigene HLA-Moleküle und bekommen so ein inhibierendes Signal, das das autogene Gewebe schützt. Die nicht-klassischen Formen sind weitaus weniger polymorph, woraus man folgern könnte, dass sie keine immunregulierende Reaktion auslösen. Es wird trotzdem angenommen, dass sie in Form der Immunmodulation auch eine anti-virale Funktion haben (O'Callaghan et al. 1998). Interessanterweise werden die nicht-klassischen HLA-G- und HLA-E-Moleküle im Gegensatz zu den klassischen HLA-A- und HLA-B-Formen von Trophoblasten und Stromazellen der Plazenta exprimiert, was eine Rolle für die Schwangerschaft vermuten lässt. Dabei weisen villöse Trophoblasten keine HLA-Moleküle auf, während man auf extravillösen

Trophoblasten die nicht-klassischen HLA-C und HLA-E Moleküle findet, sowie die für Trophoblasten typischen HLA-G Moleküle. (Trowsdale et al. 2008)

### 2.6.2 Das nicht-klassische HLA-G Molekül

HLA-G ist ein nicht-klassisches Molekül der MHC – Klasse Ib. Man findet es hauptsächlich auf Trophoblasten, Lymphozyten des peripheren Blutes, fetalem und adultem Gewebe des Auges, der Haut, sowie in fetaler Leber und fetalem Thymusgewebe (Rebmann V. 1999). Die stärkste Expression zeigen extravillöse Zytotrophoblasten im invadierenden Teil der Placenta, nahe des Myometriums, im ersten Schwangerschaftsmonat. Danach nimmt die Anzahl der HLA-G exprimierenden Zytotrophoblasten ständig ab (Le Bouteiller P. 1999).

Bisweilen sind sieben Isoformen bekannt, darunter vier membrangebundene und drei lösliche. Unser Augenmerk gilt hauptsächlich dem HLA-G1s, dem man inzwischen wesentliche Funktionen in der feto-maternalen Kommunikation zuspricht. So wird vermutet, dass es bei der Rolle der HLA-E Expression eine Rolle spielt, dass es Aufgaben in der Gefäßneubildung der Plazenta übernimmt, sowie dass es als Immunsuppressor während der Schwangerschaft wirkt (Le Bouteiller et al. 1999).

Dabei kann das inhibierende Signal, das von HLA-C, HLA-E und HLA-G der Trophoblasten gegenüber NK-Zellen vermittelt wird, nicht durch blockierende Antikörper revidiert werden. (Schaumann 2003).

## 2.7 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen wurden zuerst als wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr entdeckt, haben aber auch Funktionen in der adaptiven Immunabwehr. Sie stellen 10 bis 15% der Leukozyten im peripheren Blut dar (Robertson et al. 1990) und erkennen Viren und pathologische Neubildungen ohne vorherige Sensibilisierung und ohne Präsentation von HLA-Antigenen. (Pathak und Palan 2005)

Darüber hinaus erfüllen sie noch weitere Funktionen, insbesondere deutet vieles (s.u.) auf eine aktive Rolle in der Reproduktion hin. (Lightner et al. 2008)



### 2.7.1 Abstammung, Morphologie und Funktionsprinzipien

NK-Zellen, oder wegen ihrer zahlreichen intrazellulären Granula früher auch large granulated lymphocytes genannt, stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab. Im Gegensatz zu T-Lymphozyten erfolgt die weitere Entwicklung zur NK-Zelllinie im Knochenmark, wo sie schon die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von peripheren NK-Zellen erhalten. In einem letzten Schritt werden sie dann in die peripheren Organe befördert (Backstrom et al. 2004).

NK-Zellen selber wiederum haben unterschiedliche Phänotypen, Oberflächenantigene und damit unterschiedliche Eigenschaften. Gemeinsam ist jedoch allen das CD56-Molekül. Als Isoform eines NCAM-Moleküls (neural cell adhesion molecule) wird CD56 außerdem auf manchem Nervengewebe und einer kleinen zytotoxischen T-Zell Population gefunden (Dosiou et al. 2005).

Ein weiteres markantes NK-Zell-Molekül ist CD16. Neben dem Großteil der NK-Zellen wird es von einigen aktivierten Makrophagen, einer kleinen T-Zell-Population und von Neutrophilen exprimiert. Es stellt einen Rezeptor für den Fc $\gamma$ -Teil von Ig-G Molekülen dar und dient damit der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität. (Pathak und Palan 2005)

Charakteristisch für NK-Zellen ist auch die „missing-self“ Hypothese, die das zytotoxische Funktionsprinzip dieser Zellen erklärt. Sie beschreibt den Umstand, dass NK-Zellen transformierte Zellen töten, die keine MHC-I-Moleküle mehr aufweisen und sich damit nicht als „selbst“ ausweisen können. Das basiert auf einem Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf der NK-Zell-Oberfläche. Kommt es zu einer immunologischen Synapse zwischen NK- und Zielzelle, hängt es davon ab, welches Signal am Ende überwiegt. MHC-Moleküle haben eine Affinität zu inhibierenden Rezeptoren, wodurch die immunologische Synapse in der Regel wieder aufgelöst wird. Fehlt dieses Signal oder überwiegen die aktivierenden Faktoren, kommt es über die Freisetzung zytolytischer Granula zur Apoptose der Zielzelle (s.u.). (Pathak und Palan 2005)

Eine weitere Möglichkeit die Apoptose in Zielzellen auszulösen geschieht über den Fas-Liganden, der auf NK-Zellen exprimiert wird. Bindet dieser an ein entsprechendes Fas-Molekül, werden Kaspasen aktiviert, die zur Apoptose der Zielzelle führen. Ein Überblick über die Zytolyse-Mechanismen der NK-Zellen gibt Abbildung 4. (Pathak und Palan 2005)

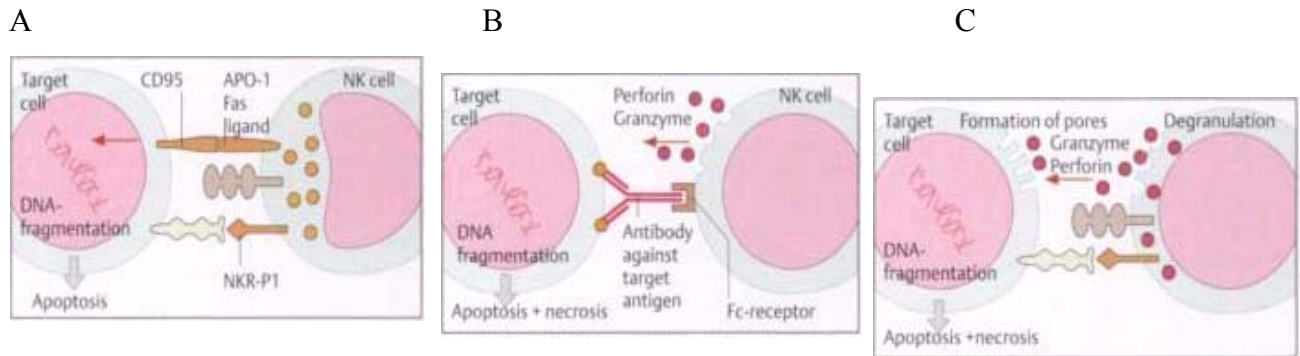


Abbildung 4: **Zytolyse-Mechanismen von NK-Zellen.** Die nicht-sekretorische Lyse (A) wird über das CD95 Antigen der Zielzelle vermittelt. Häufiger werden jedoch lytische Granula, wie z.B. Perforin und GranzymB freigesetzt, die in der Zielzelle auch zur Apoptose führen können (B). Ist die Zielzelle mit Antikörpern bedeckt, kommt es über den CD16-Rezeptor der NK-Zelle zur Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) (C).

## 2.7.2 NK-Zellrezeptoren und ihr Zytokinprofil

Die verschiedenen Funktionen der NK-Zellen mit ihrem zytotoxischen Potential oder der Zytokinsekretion zur Regulierung von Funktion, Differenzierung und Wachstum von Immunzellen werden über die Bindung von Oberflächen-Rezeptoren mit den entsprechenden Liganden vermittelt. Die „missing-self“ – Hypothese (s.o.) zur Zytotoxizität beschreibt ein Zusammenspiel zwischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. Daneben gibt es noch Zytokinrezeptoren und Adhesionsmoleküle. (Pathak und Palan 2005)

Zu den aktivierenden Rezeptoren werden CD16, NKp30, 44 und 46, einige KIR-Rezeptoren, sowie Ly49 bei der Maus gezählt. Dabei kommt es erst durch Kostimulation mehrerer Rezeptoren zu einem auslösenden Effekt; alleine das CD16-Molekül ist in der Lage ohne Co-Rezeptoren eine zytolytische Aktivität auszulösen. (Lanier, 2008)

Über aktivierende Faktoren wie Typ1-Interferone, IL-2, IL-15, IL-18 oder über direkte Rezeptor-Liganden Interaktion kommt es zu aktivierenden Signalwegen. Darunter gibt es den ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs)-tragenden Rezeptorkomplex, den NKG2D-Rezeptorkomplex, sowie Rezeptoren der CD244-Familie. (Lanier 2008)

Ob NK-Zellen dann mit Zytotoxizität oder Zytokinausschüttung reagieren, hängt von der Stärke oder Bedeutung der Summe aller Rezeptorsignale ab. Fehlen die MHC-I Signale vollständig, werden die NK-Zellen „entwaffnet“ und reagieren hyporesponsiv. (Brown et al. 2008)

NK-Zellen produzieren überwiegend Th1-Zytokine, vornehmlich  $\text{INF-}\gamma$  unter IL-12 Stimulation, wobei sie unter IL-4 Stimulation auch Th2- oder immunoregulatorische Zytokine produzieren können. Dazu zählen IL-5, IL-13,  $\text{TGF-}\beta$  und IL-10. (Higuma-Myojo et al. 2005)

CD160 gehört zu den Immunoglobulin-like Oberflächenrezeptoren, die ein aktivierendes Signal auslösen. Ihr Vorkommen auf peripheren NK-Zellen wurde bereits nachgewiesen. Dort kommt es nach Bindung des Liganden HLA-C zu einer zytotoxischen Funktion mit Ausschüttung der Zytokine IL-6, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . (Barakonyi et al. 2004)

Inhibierende Rezeptoren binden MHC-I sowie nicht-MHC-I Liganden. Es gibt monomerische TypI-Glykoproteine der Immunoglobulin Superfamilie wie KIRs (killer cell immunoglobulin-like receptors) und LILRs (leukocyte immunoglobulin-like receptors), sowie TypII-Glykoproteine mit einem „C-type lectin-like scaffold“ wie CD94/NKG2A oder Ly49 bei der Maus. Diese Rezeptoren interferieren in die aktivierenden Signalwege über ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs) in ihren zytoplasmatischen Enden. Bei Aktivierung rekrutieren sie Tyrosinphosphatasen, die eine NK-Zell Antwort unterdrücken, indem sie das Proteinsubstrat der Tyrosinkinase des aktivierenden Rezeptors dephosphorylieren. Dadurch wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, die Degranulation, Zytokinproduktion oder Proliferation der NK-Zellen beendet. (Lanier 2008)

Sowohl CD94/NKG2A, LIR-1 und -2, als auch P49 sind Rezeptoren für HLA-G1, wobei letzterer nur von dezidualen NK-Zellen exprimiert wird (Ponte et al. 1999). In der Regel ist das Rezeptoren-Repertoire der peripheren NK- und dezidualen NK-Zellen aber ähnlich. Interessanterweise scheinen sie allerdings unterschiedliche Funktionen auszuüben. Betrachtet man die Rezeptorenexpression genauer, stellt man fest, dass deziduale NK-Zellen, besonders zu Beginn der Schwangerschaft, vermehrt den Rezeptortyp KIR2D exprimieren, woraufhin es zur Zytokinsekretion kommt. Dagegen findet man bei KIR3DL1/S1, den Rezeptor für HLA-B, keine Zunahme während der Schwangerschaft (Sharkey et al. 2008). Rezeptoren für HLA-A und HLA-B weisen im Gegensatz zu den nicht-klassischen HLA-I – Molekülen einen hohen Polymorphismus auf, was für eine effektive Krankheitsabwehr sinnvoll erscheint. Dagegen kommt es bei Aktivierung von KIR2DL4 durch HLA-G zur Ausschüttung inflammatorischer und Angiogenese-fördernder Faktoren wie TNF, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und IL-8. Im Allgemeinen sezernieren deziduale NK-Zellen Zytokine, die für die Implantation und Vaskularisierung Bedeutung haben: VEGF-C, PIGF, Ang-2, TNF- $\alpha$ , IL-10, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, CSF-1, LIF, IFN- $\gamma$  (Lightner et al. 2008).

### 2.7.3 Die Granula der Natürlichen Killerzellen und ihre Funktion

Natürliche Killerzellen werden wegen ihrer zahlreichen intrazellulären Granula auch large granulated lymphocytes genannt. Betrachtet man die verschiedenen Subtypen dieser Zellen, trifft das jedoch gar nicht immer notwendigerweise zu. So findet man zwar bei der größten Population der peripheren Natürlichen Killerzellen, den  $CD56^{\text{dim}}/CD16^+$  Zellen, zahlreiche intrazelluläre Granula, doch bei der kleinen Gruppe von  $CD56^{\text{bright}}/CD16^-$  Zellen im peripheren Blut fehlen diese fast vollständig. Anders dagegen wiederum die  $CD56^{\text{bright}}/CD16^-$  Zellen in der Dezidua, die ebenfalls reich an Granula sind (Koopman et al. 2003).

Diese Granula dienen der zytotoxischen Funktion der  $CD8^+$  T-Zellen und der Natürlichen Killerzellen. Neben der Antikörper vermittelten Zytotoxizität und dem zytolytischen Weg der Fas/FasL-Bindung (s.o.) stellen sie eine weitere Möglichkeit der über NK-Zellen induzierten Apoptose dar. NK-Zell spezifische, zytotoxische Rezeptoren (NKp44, NKp46 und NKp30) aktivieren dazu eine Rezeptor abhängige Kinase Kaskade, die intrazelluläres Calcium mobilisiert, wodurch lytische Granula akkumulieren und sich in Richtung der immunologischen Synapse mit der Zielzelle formieren. Es kommt zur Sekretion der Granula-Inhalte in den synaptischen Spalt: verschiedene Granzyme, Granulysin und Perforin wirken nun auf die Zielzelle ein. (Pathak und Palan 2005)

Dabei gelangt Perforin über Polymerisierung in die Membran der Zielzelle und perforiert diese, indem es transmembranäre Poren bildet. Unter Mitwirkung von Calcium kommt es zur osmotischen Lyse. (Pathak und Palan 2005)

Granzyme dagegen sind Serin-Proteasen, die endozytotisch aufgenommen werden, in Speichervesikeln entlang Aktin und Mikrotubulusfasern zum Kern transportiert und unter Einwirkung von Perforin freigesetzt werden. Dort führen sie über Spaltung und Aktivierung von Kaspasen oder über die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c zur Apoptose. (Crncic et al. 2007)

Auch das Granulysin ist nur in Verbindung mit Calcium wirksam und erhöht den intrazellulären und mitochondrialen Calciumspiegel. Es führt zu einer Schädigung der Mitochondrienmembran, wodurch Cytochrom c freigesetzt wird, das unter Mitwirkung verschiedener aktivierter Kaspasen zur Apoptose führt. (Okada et al. 2003)

### 2.7.4 Natürliche Killerzellen im peripheren Blut

Häufig werden NK-Zellen immer noch grob nach einem vereinfachten Muster unterteilt. Dabei haben periphere NK-Zellen die Eigenschaft wenig CD56 (CD56<sup>dim</sup>), dafür aber CD16 zu exprimieren und damit zytotoxisch zu sein, während deziduale NK-Zellen viel CD56, jedoch kein CD16 exprimieren (CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup>). Tatsächlich trifft das nur für rund 95% der peripheren NK-Zellen zu; die restlichen 5% ähneln in ihren Oberflächenrezeptoren mehr den dezidualen NK-Zellen. (Koopmann et al. 2003)

Interessant ist auch, dass periphere NK-Zellen in Zahl und Aktivität während der Schwangerschaft abnehmen und vermehrt inhibierende Rezeptoren exprimieren. Dafür scheinen vor allem drei Hormone verantwortlich zu sein: Prolaktin, Östrogen und Progesteron. Bei Östrogen zeigen Versuche in vivo eine signifikante Hemmung der NK-Zell Aktivität, die bei in vitro Versuchen nicht wiederholt werden konnte (Dosiou et al. 2005).

Man könnte sich dies durch eine zusätzliche indirekte Wirkung von Östrogen erklären, beispielsweise über andere Immunzellen und Zytokine. Widersprüchlich ist nur die Tatsache, dass die Wirkung von Östrogen auf T-Zellen eher zu einer Aktivierung von NK-Zellen führen sollte. Es wurde gezeigt, dass Östradiol die INF- $\gamma$  Produktion von T-Zellen fördert, was zu einer Aktivierung der NK-Zellen führen würde. Das konnte sich allerdings bei in vivo Versuchen nicht bestätigen. Im Gegensatz dazu scheint Progesteron die NK-Zell Aktivität einheitlich zu supprimieren – sofern man es jedenfalls in Dosen einsetzt, die man im Uterus vermutet. (Dosiou et al. 2005)

### 2.7.5 Natürliche Killerzellen in der Plazenta

Im ersten Schwangerschaftstrimenon machen Leukozyten 30% der Stromazellen des Endometriums aus, davon sind über 70% deziduale Natürliche Killerzellen. Anders als im peripheren Blut erfüllen sie hier jedoch nicht primär die Aufgabe der Bekämpfung von Pathogenen und Neubildungen, sondern gelten mittlerweile als wesentlich für eine erfolgreiche Implantation und Entwicklung der Schwangerschaft. (Koopmann et al. 2003)

Wie oben beschrieben ähneln die dezidualen NK-Zellen der kleinen Gruppe von CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> NK-Zellen im peripheren Blut. Man nimmt daher an, dass sie von diesen abstammen. Allerdings geht man auch von weiteren Differenzierungsschritten aus, da die dezidualen NK-Zellen im Gegensatz zu peripheren NK-Zellen KIR<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> und CD62L<sup>-</sup>

sind. Damit liegt nahe, dass diese Zellen auch funktionelle Unterschiede aufweisen. (Moffett-King 2002)

Einen weiteren entscheidenden Unterschied zwischen pNK- und dNK-Zellen findet man, betrachtet man ihre Anzahl während der Schwangerschaft. Anders als im peripheren Blut nimmt die Anzahl an NK-Zellen in der Dezidua besonders im ersten Schwangerschaftstrimenon zu. Des Weiteren ist eine Abnahme in der Expression von Aktivierungsmarkern zu erkennen, so zum Beispiel CD69 oder HLA-DR. Verantwortlich für diese Veränderungen und Differenzierungen sind nach derzeitigem Stand vor allem die Hormone Progesteron und Östrogen, wobei auch dem Prolaktin eine Rolle in der Reifung der dNK-Zellen zugesprochen wird. Allerdings gibt es noch viel Unklarheit über die genauen Wirkungsmechanismen. Vor allem stellt man sich die Frage, inwieweit die Hormone direkt über NK-Zellrezeptoren bzw. indirekt auf die Natürlichen Killerzellen wirken. Dies aufgrund der Tatsache, dass Progesteron in einer Leukozyten Kultur des Endometriums zu einer Proliferation und Differenzierung von dezidualen NK-Zellen führt, wohingegen aufgereinigte CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> Zellen des Endometriums keine Reaktion zeigen. (Manaster und Mandelboim 2007)

Das Suchen von Steroidrezeptoren auf dezidualen Natürlichen Killerzellen war erst wenig erfolgreich, bis 1996 Henderson et al. mRNA für ER $\beta$ cx/ $\beta$ 2, ER $\beta$ 1 und den GR in dezidualen NK-Zellen nachweisen konnten (Henderson et al. 2003). Die Rolle dieser Rezeptoren bleibt jedoch weiterhin fragwürdig, da ER $\alpha$ - und  $\beta$ - knockout Mäuse sowohl eine vollständige dNK-Zellpopulation aufweisen als auch die entsprechenden Veränderungen an den mütterlichen Spiralarterien stattfinden. (Dosiou und Giudice 2005)

Direkte Hormoneffekte auf deziduale Natürliche Killerzellen werden für die Genexpression von immunmodulierenden Proteinen angenommen. Dafür scheint hauptsächlich Progesteron verantwortlich zu sein, das u.a. über die Expression von Glycodelin und Galectin-1 in dNK-Zellen eine Immunsuppression bewirkt. (Dosiou und Giudice 2005)

Die indirekten Wirkungen von Progesteron auf deziduale NK-Zellen werden vor allem über zwei weitere Zelltypen vermittelt. Zum einen begünstigt Progesteron die Differenzierung in T-Lymphozyten von TH1 zu TH2 (s.o.), zum anderen wurde die Produktion von VEGF, MIP-1 $\beta$ , Prolaktin und IL-15 über Stromazellen des Endometriums unter Progesteroneinfluss nachgewiesen. Dies hat zur Folge, dass dNK-Zellen in die Dezidua wandern und dort proliferieren. Die Wirkung von Progesteron auf NK-Zellen ist zusammenfassend in Abbildung 3 dargestellt. (Dosiou und Giudice 2005)

Die Funktion dieser Zellen ist jedoch nach wie vor unklar. Tierversuche haben gezeigt, dass Mäuse auch ohne deziduale NK-Zellen eine erfolgreiche Schwangerschaft haben können. Dennoch lassen viele Hinweise vermuten, dass dNK-Zellen zumindest beim Menschen wesentlich für einen komplikationslosen Schwangerschaftsverlauf sind. Auffallend ist vor allem erstmal ihr enormer Anstieg während des ersten Trimenons, in der Implantationsphase, bzw. während der Plazentareifung. Die Tatsache, dass man sie in der Nähe von Trophoblasten findet und dass sie Zytokine exprimieren, die an deren Rezeptoren binden, legt eine Interaktion zwischen diesen beiden Zelltypen nahe. Wahrscheinlich ist eine Regulierung von Plazenta- und Trophoblasten-Wachstum über eine Stimulierung der DNA-Synthese; diskutiert wird aber auch eine Rolle in der Kontrolle dieses Wachstums über zellvermittelte Zytotoxizität. (Moffett-King 2002)

Letztlich scheint auch die Expression von immunmodulierenden Molekülen, wie beispielsweise dem Galektin-1 und dem Glykodelin A, eine Funktion dieser Zellen widerzuspiegeln (Blois SM et al. 2007). Neben einer Beeinflussung der Zytokine werden hauptsächlich T-Zellen in ihrer Proliferation und Aktivierung gehemmt.



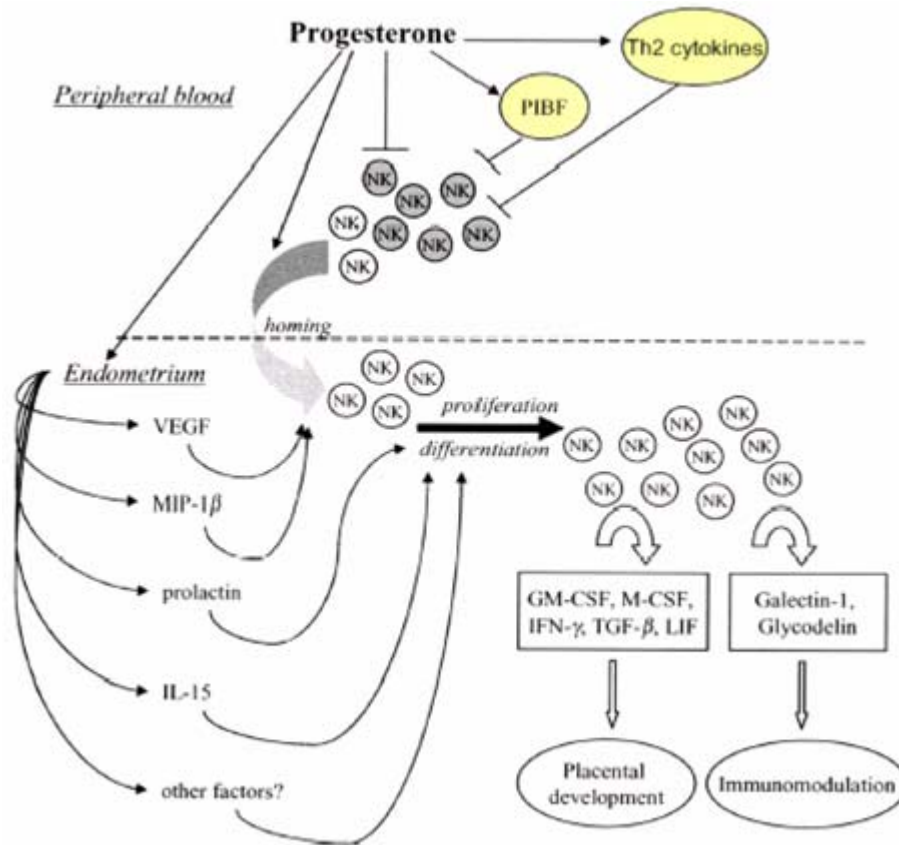


Abbildung 3: **Modell der hormonellen Regulation der NK-Zellen in der Schwangerschaft.**

Während der Schwangerschaft kommt es unter Progesteroneinfluss zu einer Abnahme der Anzahl, Aktivierung und Zytotoxizität peripherer NK-Zellen über direkte Wirkung an NK-Zellen und/oder über Stimulierung der Th2 Zytokin- und PIBF – Konzentration von T-Zellen. Indem die Expression von homing – Rezeptoren über die VEGF und MIP-1β Expression induziert wird, wird auch das homing in das Endometrium gefördert. Zudem wird das Endometrium u.a. zur Produktion von IL-15 und Prolaktin angeregt, wodurch die Proliferation, Differenzierung und Zytokinproduktion von NK-Zellen reguliert wird. ○: CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen; ●: CD56dim CD16<sup>+</sup> NK-Zellen

## 2.8 Bedeutung für die Klinik

### Präeklampsie

Die Präeklampsie ist eine Erkrankung in der Schwangerschaft, die seit den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewinnt. Mittlerweile leiden 5 bis 10 Prozent aller Schwangeren an Hypertonie (>140/90 mmHg), Proteinurie (>100mg/dL) und/oder Ödemen – den Leitsymptomen dieser Vorstufe der Eklampsie. (Rath 2005)

Die Ursachen sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Diskutiert werden eine Störung im Prostaglandinstoffwechsel als auch eine gestörte Implantation des Trophoblasten. In beiden



Fällen kommt es zu einer Fehlentwicklung der arteriellen Gefäße in der Plazenta, wobei ein Zusammenhang mit dem Immunsystem wahrscheinlich ist. (Salafia et al. 1995)

Die Pathophysiologie der Präeklampsie beinhaltet mütterliche und fetale Faktoren. So führt eine Fehlregulation der plazentaren Vaskularisierung in der frühen Schwangerschaft mit konsekutiver Hypoxie zu einer Ausschüttung von Faktoren in den mütterlichen Kreislauf, die wiederum die Endothelfunktion beeinträchtigen und Hypertension und weitere Krankheitsmerkmale nach sich ziehen. Andererseits kann auch ein primärer Mangel der VEGF-Aktivität durch erhöhte Konzentration der VEGF-Antagonisten diesem Krankheitsbild zugrunde liegen. (Ness B und Sibai B 2003)

Die gestörte Invasion des Trophoblasten wird vielseitig diskutiert. Deziduale NK-Zellen, die hauptsächlich mit den Trophoblasten interagieren, scheinen diesen Vorgang zu regulieren. Dies geschieht über KIR2D/HLA-C Interaktion (s.o.). Dabei spielt der KIR Haplotyp der Trophoblasten, sowie die HLA-C – Gruppe der NK-Zellen eine Rolle. Kommt es zu einem KIR AA – Genotyp der Mutter mit vorwiegend inhibitorischen KIR-Rezeptoren und einer HLA-C2 Expression der fetalen Trophoblasten, besteht ein erhöhtes Risiko für Präeklampsie. (Sharkey et al. 2008).

Hong et al. weisen dezidualen NK-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Präeklampsie zu. Ein Ungleichgewicht zwischen inhibierenden und aktivierenden KIR-Rezeptoren auf NK-Zellen soll eher dafür verantwortlich sein als der Polymorphismus der HLA-C Gene auf Trophoblasten (Hong et al. 2008). Auch Miko et al. sprechen in diesem Zusammenhang von einer veränderten Expression von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf invarianten NKT-Zellen (Miko et al. 2008).

Mögliche andere Ursachen könnten in einem Missverhältnis zwischen Prostazyklin und Tromboxanen liegen, was mit Vasokonstriktion verbunden ist. Nachgewiesen wurde, dass Vitamin E die Vasokonstriktion senkt und die Prostazyklinfreisetzung fördert. Prostazyklin ist ein Metabolit der Arachidonsäure, der die Plättchenaggregation und die Uterinkontraktilität hemmt und die Vasodilatation erhöht. (Ramon et al. 2007, Scholl et al. 2006)

Anhand der Präeklampsie, die spezifisch für den Menschen zu sein scheint, lässt sich demnach sehr schön zeigen, dass einige immunologische Aspekte der Schwangerschaft ebenfalls einzig „artig“ sind und so auch der Vorgang der Trophoblasteninvasion nicht bis ins Detail am Tiermodell erklärt werden kann. (Chaouat 2007)

### 3. Ziele dieser Arbeit

Ziel der Arbeit war eine umfassende Klärung bezüglich Funktion und Funktionsweisen der Natürlichen Killerzellen im Verlauf der Schwangerschaft. Aufbauen konnte man auf Vorarbeiten, nach denen dezidualen NK-Zellen vollkommen andere Eigenschaften und Funktionen zugeschrieben wurden als peripheren NK-Zellen. Dabei gab es Hinweise auf entscheidende Interaktionen mit HLA-G und Trophoblastzellen. Auch ein gesteigertes Vorkommen von HLA-C in der Dezidua ist bekannt. So wird vermutet, dass die deziduale NK-Zelle die Implantation der Frucht und Frühschwangerschaft unterstützt, wohingegen ihre zytotoxischen Eigenschaften unterdrückt werden.

Es ergaben sich folgende Fragen, zu denen jeweils verschiedene Versuche vorgesehen waren:

Wird der HLA-Klasse I Rezeptor CD160 in unterschiedlichem Maß auf peripheren und dezidualen Natürlichen Killerzellen exprimiert?

> Es sollte dazu mittels FACS-Analyse die CD160-Expression auf Natürlichen Killerzellen untersucht werden, um einem möglichen Wirkmechanismus von HLA-C und eventuell auch HLA-G nachzugehen. Dabei könnte dann auch die CD160-Expression auf NK-Zellen im peripheren Blut und in der Plazenta mit der Expression auf T-Zellen verglichen werden.

Wie wird die Zytotoxizität der Natürlichen Killerzellen reguliert? Besteht ein Zusammenhang zwischen den intrazellulären Signaltransduktionsmolekülen STAT3 bzw. seinem Inhibitor SOCS3 und den zytotoxischen Granulainhalten?

> Hierzu wollten wir die Granula der NK-Zellen untersuchen, im Speziellen Perforin, Granulysin und Granzym B, die für die Zytotoxizität der NK-Zelle eine Rolle spielen. Daneben sollte bei einer NK-Zelllinie (NK92) auch SOCS3 bzw. STAT3 als wichtiger Signaltransduktionsweg der NK-Zelle mittels RNA Interferenz ausgeschalten werden. Ein Zusammenhang von STAT3 mit der zytotoxischen Wirkung der NK-Zellen ist bekannt. Es galt nun festzustellen, ob dies über die Granzym B, Perforin und Granulysin Expression geschieht.

Welche Effekte haben Schwangerschaftshormone, insbesondere Progesteron, auf Vorkommen und Funktion der dezidualen Natürlichen Killerzellen bei gesunden Eizellspenderinnen? Inwieweit wird ihre Wirkung über angiogene Faktoren wie VEGF oder immunmodulierende Faktoren wie IL-6 vermittelt? Welcher Zusammenhang besteht zwischen VEGF und der Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen?

> In den Versuchen dazu sollten zytotoxische und regulatorische NK-Zellen von Patienten verglichen werden, die teilweise mit GnRH-Agonisten stimuliert wurden. Zudem sollte der Effekt einer lokalen Verletzung des Endometriums durch Biopsieentnahme auf das Gleichgewicht der NK-Zellen und die VEGF- und IL-6-Konzentration getestet werden. Der Einfluss einer erhöhten Progesteron-Konzentration auf das Homing der NK-Zellen war ebenfalls zu bestimmen.

In wieweit spielen Natürliche Killerzellen bei spontanen Aborten und Präeklampsie eine Rolle? Tragen sie eventuell auch mit ihrer zytotoxischen Funktion zu einer physiologisch verlaufenden Schwangerschaft bei? Weisen Abort gefährdete Patientinnen Besonderheiten bezüglich ihrer Apoptosevorgänge auf?

> Hier sollten zuletzt noch Apoptose-Prozesse bei der Implantation über die Bcl-2- und Bax-Expression untersucht werden. Da zytotoxische NK-Zellen sowohl von Apoptose selbst betroffen sein können, als auch diese induzieren, sollte überprüft werden, inwieweit eine Fehlregulation der apoptotischen Prozesse in der Pathogenese von wiederholten Spontanaborten involviert ist.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Biologische Materialien**

#### **a) Versuche zur zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen**

##### **NK-Zellen - Zellkultur**

Als Gewebe zur Isolation von uterinen NK-Zellen dienten humane Plazenten nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf und termingerechter Geburt. Für die peripheren NK-Zellen wurde das entsprechende mütterliche Blut durch Auswaschung der Plazenta oder über direkte Blutentnahme gewonnen. Daneben wurde zur besseren Kontrolle und Ausschaltung weiterer Einflussgrößen mit einer Zelllinie gearbeitet. Dazu wurde die Natürliche Killerzelllinie NK-92 (ATCC® Nummer CRL-2407™) kultiviert. Sie geht aus den peripheren mononuklearen Blutzellen eines Patienten mit stark progressivem non-Hodgkin Lymphom hervor. Die Kultivierung erfolgte in RPMI Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 2 % Penicillin/Streptomycin. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium erneuert und die Zellen falls notwendig verdünnt. Das Überleben und die Proliferation der Zelllinie wurden durch die Zugabe von rekombinanten IL-2 (10 ng/ml, Zugabe alle 2-3 Tage) gewährleistet.

##### **B-Lymphoblastzelllinie 221.G1s – Zellkultur**

Zur Herstellung von löslichem HLA-G1 wurde die B-Lymphoblastzelllinie 221.G1s kultiviert, die das HLA-G1 Molekül produziert. Dazu wurde die transfizierte Lymphoblastzelllinie mit ca. 500.000 Zellen/ml Medium Compleat in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37°C im Inkubator kultiviert. Bei normalem Zellzyklus war eine Aufteilung in zwei 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen alle 2-3 Tage nötig. Nach einer mikroskopischen Kontrolle des Zellzustandes wurden sie für 5min mit 550g bei 18-20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt zur HLA-G1s-Reinigung mit W6/32-Sepharosekügelchen weiterverwendet oder bei -20°C in 50ml Falcons eingefroren. Die Kulturdauer der 221.G1s war auf maximal 3 Wochen begrenzt.

##### **Hybridom W6/32 – Zellkultur**

Die Hybridomzellen W6/32 produzieren Antikörper gegen Antigene der HLA-Klasse I und somit auch gegen HLA-G1s. Zellführung und Zellzyklus verhielten sich wie zuvor beschrieben (siehe B-Lymphoblastzelllinie).

Die Zellen wurden mikroskopisch kontrolliert und in dem Medium Complet für 5min bei 550g und 18-20°C abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in proteinfreies Medium umgesetzt, wo sie den Antikörper produzierten. Die Zellkultur wurde bis zu 7 Tage in der Zellkulturflasche unter Zugabe von frischem Medium weitergeführt.

## **b) Versuche zu antioxidativen und immunmodulatorischen Zusammenhängen**

### **Gewebe aus dem Endometrium und peripheres Blut**

Endometriales Gewebe durch Biopsieentnahme und peripheres Blut wurden 5-8 Tage nach erfolgter Ovulation, im Zeitfenster der Implantation, von insgesamt 100 Patientinnen im Alter zwischen 22 und 38 Jahren des medizinischen Instituts HALITUS in Buenos Aires (Argentinien) gewonnen. In einem ersten Teil dieses Projektes, dessen Ergebnisse hier dargestellt werden, untersuchten wir die Gruppen D und E. Diese bestanden aus 40 Eizell-Spenderinnen ohne Lebendgeburten. Das Durchschnittsalter dieser Patientinnen betrug 26,4 Jahre. Sie wurden teilweise mit dem GnRH-Agonisten Kurzprotokoll stimuliert. Es gab jeweils Untergruppen, in denen eine lokale Verletzung des Endometriums durch Biopsieentnahme im vorangegangenen Ovulationsfenster durchgeführt wurde. Tabelle 1 stellt eine Übersicht der Patientengruppen dar.

Tabelle 1: Übersicht der Patientengruppen

Patientengruppe	Gruppe E: Fertile Frauen unter Stimulation der Ovarien		Gruppe D: Fertile Frauen im natürlichen Zyklus	
	EI	EII	DI	DII
1. endometriale Biopsieentnahme	-	+	-	+
2. endometriale Biopsieentnahme	+	+	+	+

## **c) Versuche zu apoptotischen Prozessen bei Abort gefährdeten Patienten**

### **Gewebe aus dem Endometrium**

Mittels Biopsie wurde endometriales Gewebe von Patienten der Outpatient Clinic of Habitual Abortion, Federal University of Sao Paulo (UNIFESP-EPM) gewonnen. Dazu wurden 9 Frauen mit einer Geschichte von drei oder mehr aufeinander folgenden und unerklärten Spontanaborten ausgewählt. In allen Fällen wurden endokrine, genetische, mikrobiologische oder anatomische Ursachen ausgeschlossen. Als Kontrollgruppe dienten sechs Frauen aus dem Outpatient Department of Gynecology von der UNIFESP-EPM, die bereits zwei oder mehr erfolgreiche Schwangerschaften hatten.

## **4.2 Geräte und Reagenzien**

### ***Geräte***

Autoklav	KSG-112-Olching
Brutschrank	Hera Cell, Heraeus
Durchflusszytometer	FACS Calibur (BD)
MACS Midi Multi Stand	Miltenyi Biotech
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Neubauerkammer	Optik Labor
Pipetten	Eppendorf, Gilson, Hirschmann
Orbitalschüttler Polymax 1040	Heidolph
Spektrophotometer Cary UV 50	Bio Varian
Waagen	Satorius Basic
	Owa Labor (VEB Wägetechnik Rapido)
Zentrifugen	Biofuge 13 (Heraeus)
	Mikro 22R (Hettich)
	Megafuge 1.0 (Heraeus)
	Universal 30F (Hettich)

### ***Verbrauchsmittel***

Eppendorfgefäße 0,5; 1,5; 2 ml	Sarstedt
Filter Ultrafree-15	Millipore
Küvetten	Sarstedt
MACS Separation Columns LS	Miltenyi Biotech
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Eppendorf
PP-Testtubes Falcon 15, 50 ml	Greiner
Zellkulturflaschen 50, 250 ml	Greiner
Zellkulturplatten 6, 12, 24, 96-well	Greiner

### ***Reagenzien***

Antibiotic Antimycotic Solution	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bradfordstammlösung	BIORAD
Brefeldin	Immunotools
Ethanol	Roth
Ethanolamin	Prolabo France
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
FACS Clean	BD
FACS Flow	BD
FACS Rinse	BD
Fetales Kälberserum	Bio Whittaker
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
HCl	Prolabo France
Human IL-2	Novitec
Humanes IL-15	ImmunoTools
Ionomycin	ImmunoTools
Lymphozytenseparationsmedium	PAA Laboratories

Medium complet	500ml RPMI 1640 mit 5ml Natrium Pyruvat, 50ml Kälberserum, 50.000 Einheiten Penicillin und 50mg Streptomycin
Medium Hybridoma	GibcoBRL, 12040-051
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T.Baker
Natriumpyruvat	Invitrogen
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Prolabo France
Nuklease-freies Wasser	Ambion
Penicillin/Streptomycin	PAA
PBS	Biochrom
RPMI 1640	PAA
Saponin	FLUKA
Sepharsekugeln	Amersham, 170906
TRIS	Quantum Appligene
Zell-Lysepuffer	Cell Signaling Technology

**Sequenzen der Oligonukleotide**      Ambion

SCR STAT3

Sense 5'-GCCACUUAUAAAUUCGUUCtt-3'

Antisense 5'-GAACGAAUUUAUAAGUGGCtt-3'

STAT3

Sense 5'-UGUUCUCUAUCAGCACAAUtt-3'

Antisense 5'-AUUGUGCUGAUAGAGAACAAtt-3'

SOCS3

Sense 5'-GACCUUCAGCUCCAAGAGCtt-3'

Antisense 5'-GCUCUUGGAGCUGAAGGUCtt-3'



### ***Zellkulturmedien***

RPMI 1640	Bio Whittacker
PBS	Bio Whittacker
DMEM	Bio Whittacker

### ***Verwendete Antikörper***

HRP-konjugierte monoklonale Antikörper

Anti-rabbit IgG	Cell Signaling Technology
-----------------	---------------------------

Anti-mouse IgG	Cell Signaling Technology
----------------	---------------------------

Fluoreszenz-konjugierte Antikörper

Goat anti-mouse IgG-PE	Dako A/S
------------------------	----------

Goat anti-rabbit IgG-Cy3	Dianoya
--------------------------	---------

Multi Mix™ Triple-Colour Control Reagent	Dako A/S
------------------------------------------	----------

Mouse anti-human CD160-PE	BeckmanCoulter
---------------------------	----------------

Mouse anti-Human GranzymB-PE	ImmunoTools
------------------------------	-------------

Mouse anti-human Perforin-FITC	BD
--------------------------------	----

Mouse anti-human Granulysin-APC	BD
---------------------------------	----

Goat anti-mouse FITC (fluorescein isothiocyanate)	ImmunoTools
---------------------------------------------------	-------------

Anti-human IL-6	ImmunoTools
-----------------	-------------

Anti-human VEGF	ImmunoTools
-----------------	-------------

Anti-CD3-Cy5 / PE	DAKO
-------------------	------

Anti-CD16-RPE / FITC	DAKO
----------------------	------

Anti-CD56-FITC / PE	DAKO
---------------------	------

### ***Zusammensetzungen von Puffern***

Saponin-Waschpuffer: 2% FKS; 0,1% Natriumazid; 0,1% Saponin in PBS

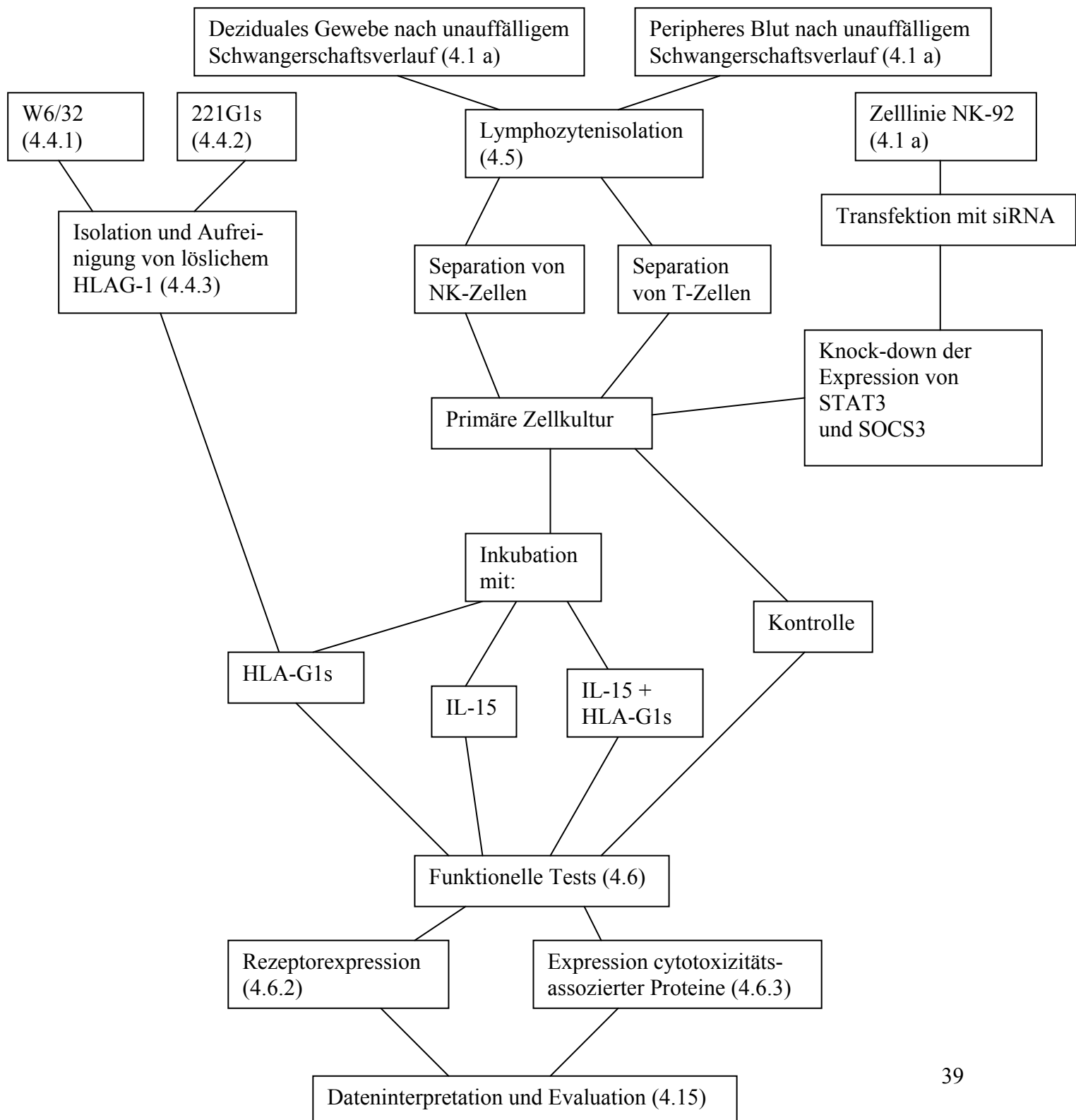
### ***Versuchsdurchführung***

Die Experimente in dieser Arbeit wurden im Plazentalabor der Frauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Gabriela Gutiérrez an der IDEHU-CONICET in Buenos Aires und mit Dr. Silvia Daher an der UNIFESP-EPM in São Paulo durchgeführt. In der folgenden Methodenübersicht werden die einzelnen Teile der Arbeit mit dem jeweiligen Ort der Versuchsdurchführung dargestellt.

## 4.3 Methodenübersicht

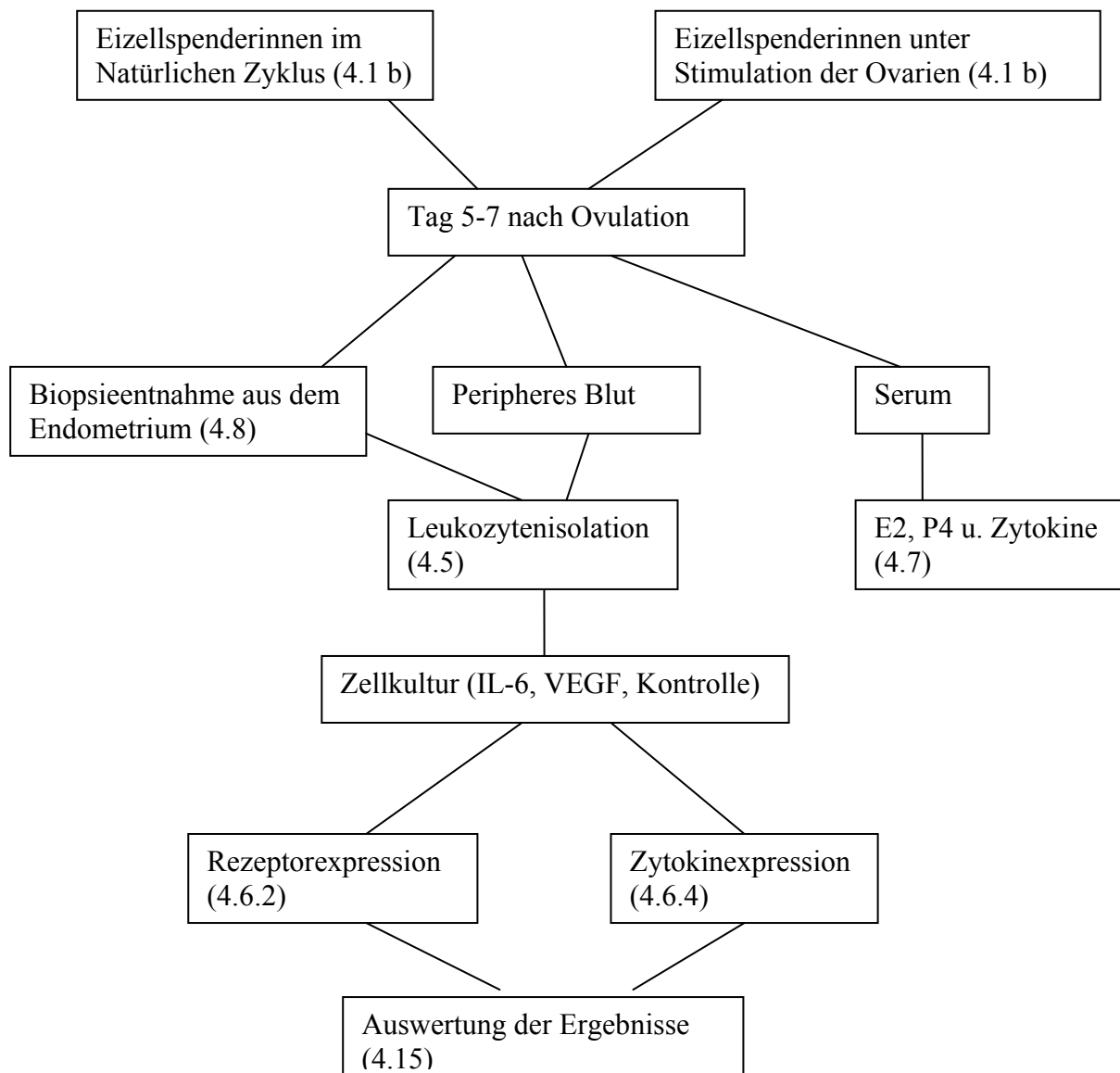
### a) Versuche zu zytotoxischen Funktionen der NK-Zellen

Dieser Teil der Arbeit wurde im Plazentalabor der Frauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt. Anne Braunschweig half mir bei den Versuchen mit der Zelllinie NK-92 und transfizierte die Zellen mit der siRNA.



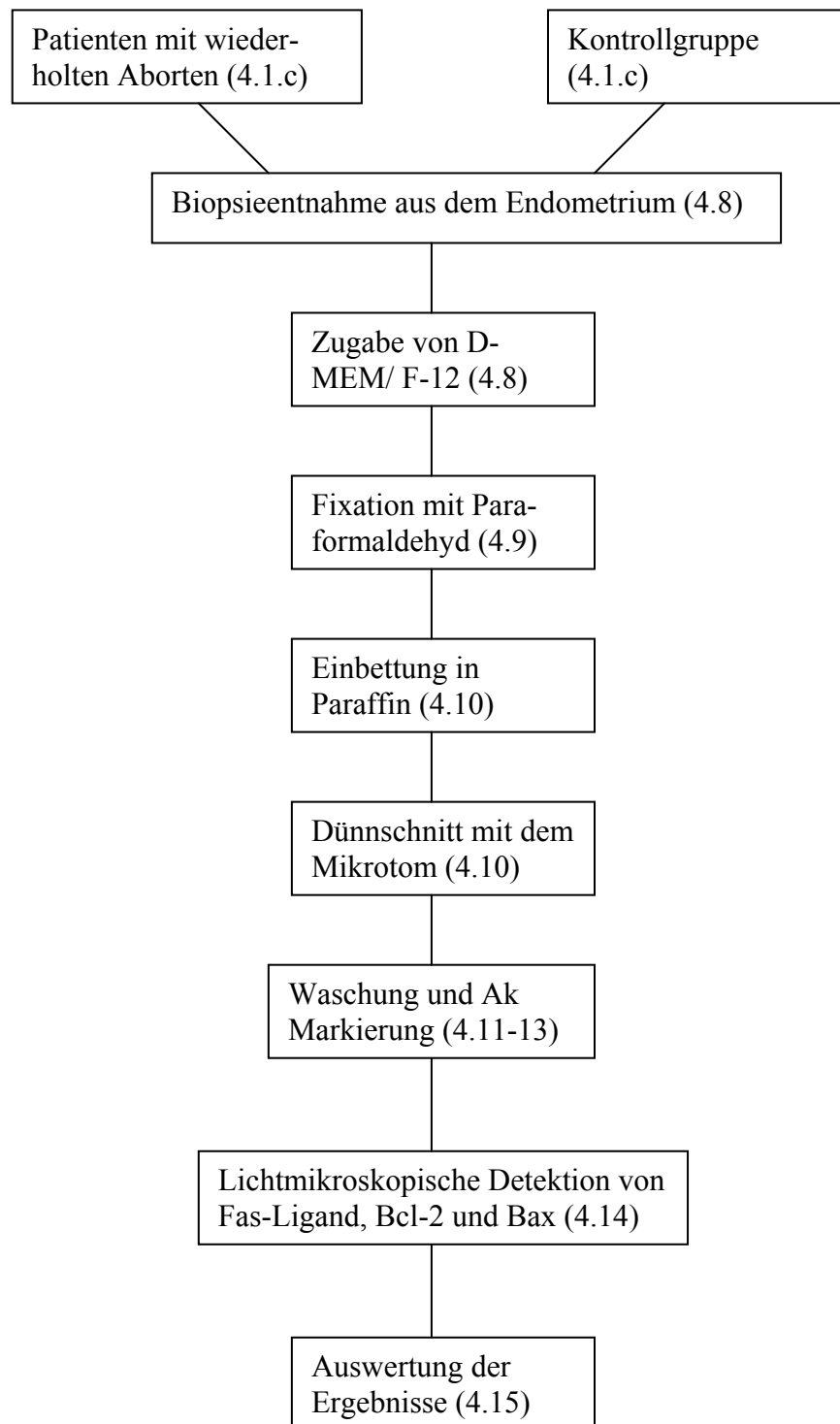
## b) Versuche zu antioxidativen und immunmodulatorischen Zusammenhängen

Die Experimente zu diesen Versuchen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Gabriela Gutiérrez und Gisela Junovich während eines Forschungsaufenthaltes an der IDEHU-CONICET (Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral), FFyB (Facultad de Farmacia y Bioquímica), UBA (Universität von Buenos Aires), in Argentinien durchgeführt. Die hier dargestellten Ergebnisse umfassen nur einen Teil des gesamten Projektes, das dort weitergeführt wird.



### c) Versuche zu apoptotischen Prozessen bei Abort gefährdeten Patienten

Die Ergebnisse zu diesem Teil entstanden unter Leitung und Zusammenarbeit mit Dr. Silvia Daher und Erica Giovana Barreiro während eines Forschungsaufenthaltes an der Paulista Medical School, Department of Obstetrics, São Paulo Federal University (UNIFESP-EPM), São Paulo, Brazil.



## 4.4 Isolierung von sHLA-G

Die Isolierung und Aufreinigung von HLA-G1s geschieht mit Hilfe des entsprechenden Antikörpers W6/32 aus den 221.G1s-Zellkulturüberständen. Dieser wurde zuvor an Sepharosekügelchen gebunden, um die Abzentrifugation nach Ankopplung des Liganden zu ermöglichen.

### 4.4.1 Antikörperproduktion W6/32

Zur Herstellung des HLA-G1s Antikörpers wurde die Hybridom-Zelllinie W6/32 wie oben beschrieben kultiviert. Nach Abzentrifugation der Zellen (550g, 5 min, 18-20°C) wurde der Überstand gesammelt und bei 4°C über 12h mit 81,8 ml gesättigter  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Lösung pro 100ml Überstand versetzt. Die leicht trübe Lösung wurde mit 2000g für 10min bei 4°C zentrifugiert und das Präzipitat in 1ml PBS pro 100ml Ausgangsüberstand wieder gelöst. Dieses gelöste Präzipitat wurde für 72 Stunden bei 4°Celsius gegen PBS dialysiert (Dialyseschlauch mit MW 6000).

Die Konzentration an W6/32 wurde mit dem Bradford-Test bestimmt. Nach dieser Methode werden 5 µl der Probe zu 995 µl Protein Assay Lösung gegeben und im Dunkel bei Raumtemperatur für 10min inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgt in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595nm. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration dient eine Standardkurve mit zuvor gemessenen und bekannten Konzentrationen an BSA.

Die Spezifität des W6/32 wurde bereits von Mitarbeitern in Vorversuchen in Westernblots nachgewiesen.

### 4.4.2 W6/32 beschichtete Sepharosekügelchen

Die mit Hilfe des Hybridoms hergestellten W6/32 Antikörper werden über eine Esterbindung an die terminale Carboxylgruppe der Sepharose gebunden. Dazu wurden die Antikörper auf 4mg/ml PBS konzentriert. 1ml der Sepharosekügelchen wurde zweimal mit 30ml 1mMolarer HCL Lösung bei 4°C gewaschen und jeweils mit 300g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die verbleibenden Kügelchen in 2ml Reagenzgefäße nach Eppendorf transferiert. Nach erneuter Zentrifugation mit 50g bei 4°C für 2min wurden die Reagenzgefäße nach Eppendorf aus der Zentrifuge genommen und zur weiteren Verlustminimierung der Überstand erst nach 2-3 min abpipettiert. Bei einem pH-Wert von 6-8

wurden 1ml der Sepharosekügelchen mit 1ml des Antikörpers W6/32 inkubiert. Für 12-18 Stunden wurden diese bei 18-20°C mit Hilfe eines Rotators gemischt und danach für 2min bei 50g und 4°C zentrifugiert. Nach erneuter 2-3 minütiger Wartezeit wurde der Überstand verworfen und die unbesetzten Stellen der Sepharosekügelchen mit 100mMolarem Ethanolamin blockiert. Zwei Waschgänge mit PBS bei 4°C und eine anschließende Zentrifugation für 2min bei 50g und 4°C folgten. Nach dem Waschschrift wurden die W6/32-Sepharosekügelchen in 1ml PBS bei 4°C aufbewahrt.

### 4.4.3 HLA-G1s Reinigung aus 221.G1s-Zellkulturüberständen

Mit Hilfe der W6/32-Sepharosekügelchen wird HLA-G1s in den 221.G1s Zellkulturüberständen detektiert und nicht-kovalent über Salzbrücken gebunden. Nach Abzentrifugation der Kügelchen wird die Bindung über eine pH-Wert-Gradienten-Elution wieder gelöst und das HLA-G1s in Fraktionen aufgefangen.

Zunächst wurden 50ml des 221.G1s Zellkulturüberstandes mit 10µl Protease-Inhibitor-Schutz aufgetaut und anschließend mit 0,5ml W6/32-Sepharosekügelchen bei 4°C für 12-18 Stunden auf einem Rotator inkubiert. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 4°C mit 300g. Der Überstand wurde wie oben beschrieben abgenommen und mit derselben Zentrifugeneinstellung zweimal mit 30 ml PBS gewaschen. An den Transfer der 0,5ml HLA-G1s-W6/32-Sepharosekügelchen in ein 2ml Reagenzgefäß nach Eppendorf schloss sich eine 2 minütige Zentrifugation bei 4°C mit 50 g an. Nach Abnahme des Überstandes wurde 1ml eines 0,1Molaren Glycinpuffers (pH Wert 11,5) den Reagenzgefäßen bei 4°C zugesetzt. Eine weitere Zentrifugation mit denselben Einstellungen folgte. Es schloss sich eine 2 minütige Zentrifugation bei 4°C und 50g an. Der Überstand wurde vorsichtig in ein 2ml Reagenzgefäß nach Eppendorf überführt und mit 1ml 1Molaren TRIS-Puffer (pH-Wert 7,5) versetzt. Das HLA-G1s-W6/32-Sepharosekügelchen-gefüllte Reagenzgefäß nach Eppendorf wurde erneut mit 1 ml des Glycinpuffers gemischt und im Weiteren wie zuvor vorgegangen. So entstanden insgesamt 10 Fraktionen mit TRIS-Glycin Puffergemisch und heruntergewaschenem HLA-G1s. Die W6/32-Sepharosekügelchen wurden zweimal mit PBS gewaschen und bei 4°C bis zum nächsten Einsatz aufbewahrt. Die 10 Fraktionen wurden nun gepoolt und mit Hilfe eines 5K NMWL Millipore Filter bei 1800g und 4°C bis zu einem Endvolumen von ca. 500µl aufkonzentriert. Das TRIS-Glycin Puffergemisch des Konzentrates wurde nun in 4 Waschschritten gegen PBS ausgetauscht. Anschließend wurden jeweils 4ml PBS auf das Konzentrat in dem Filter gegeben und bis zu einem Endvolumen von ca. 500µl bei 1800g und 4°C zentrifugiert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie oben beschrieben nach der Bradford-Methode. Anschließend wurde in an die Versuchsreihen angepassten Konzentrationen aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. In Vorversuchen wurde bereits durch Westernblot die Reinheit und Spezifität des HLA-G1s getestet.

## 4.5 Isolierung von Lymphozyten und NK-Zellen

Um gewebsständige NK-Zellen aus der Plazenta zu erhalten werden zunächst unter sterilen Bedingungen 2-3 cm große Gewebstücke von den Kodylonen aus der mütterlichen Seite der Plazenta geschnitten und mehrmals mit sterilem PBS gespült, bis das mütterliche Blut ausgeschwemmt ist. Es erfolgt die Zerkleinerung des Gewebes in Petrischalen mit dem Skalpell unter Zugabe von 5ml RPMI-Medium und  $40\mu\text{l}$  Kollagenase (100U) pro 10g Gewebe. Anschließend wird für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Um die Zellsuspension von dem Gewebe zu befreien wird sie durch ein Sieb gedrückt und mit RPMI-Medium nachgespült. Die Suspension wird auf 3ml Ficoll in einem 15ml Reaktionsgefäß vorsichtig aufgeschichtet und bei 800g für 20min zentrifugiert.

Danach war die Auftrennung wie folgt zu erkennen und in der Abbildung 4 dargestellt:

Die unterste Schicht bilden die Erythrozyten, dann folgt das Ficoll und darüber findet man die in der Abbildung markierte Schicht aus Lymphozyten und Monozyten. Ganz oben sammelt sich ein Gemisch aus Plasma und Medium.

Nun kann die Lymphozytenschicht abpipettiert und in zwei Waschschritten mit 5ml RPMI-Medium und anschließender Zentrifugation bei 600g das restliche Ficoll entfernt werden.

Für die Isolierung der NK-Zellen aus dem Lymphozyten-Monozyten-Gemisch ist eine magnetische Markierung der nicht-NK-Zellen nötig, die dann beim Durchlaufen durch ein magnetisches Feld zurückgehalten und abgetrennt werden. Dazu wird wie oben beschrieben nochmals zentrifugiert, der Überstand verworfen und dem Pellet  $2,5\mu\text{l}$  eines Antikörpermisches aus Hapten-konjugiertem anti-CD3, -CD14, -CD19, -CD36 und IgE zugegeben. Inkubiert wurde für 30min, im Dunkel, bei Raumtemperatur. Danach wurde

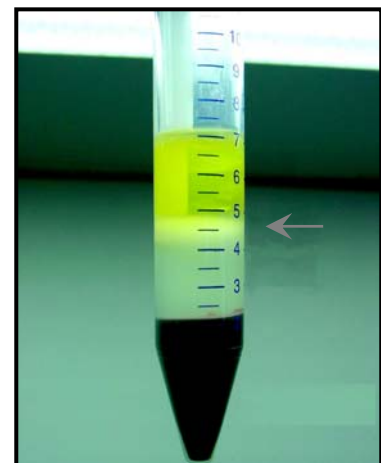


Abbildung 4: **Ficoll Gradient.** Pfeil markiert Schicht, in der Lymphozyten enthalten sind.



weitere 30min unter denselben Bedingungen mit 2,5µl der sekundären Anti-Hapten-Micro Beads inkubiert.

Nach Spülung einer MACS-Magnetsäule mit 98%igem Ethanol und anschließend mit RPMI-Medium wurde die Säule in ein homogenes Magnetfeld gebracht und die Lymphozyten mit 10ml PBS auf die Säule gegeben. Die austretende Lösung enthielt die NK-Zellen, die nach Zentrifugation bei 600g und 5min in einer Neubauerkammer gezählt wurden und in komplettem RPMI-Medium in Assay-Kulturplatten kultiviert werden konnten.

## **4.6 Funktionelle Analysemethoden**

### **4.6.1 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie oder FACS (Fluorescence-activated Cell sorter) –Analyse dient der Erkennung von Zellen, deren Oberflächen- oder intrazelluläre Moleküle zuvor mit entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert wurden.

Wir konnten hiermit die Expression von zytotoxizitäts-assoziierten Proteinen und den Oberflächenrezeptoren CD160, CD56, CD16 und CD3 bestimmen. Dazu wurden pro Messung  $10^4$  Zellen benötigt. Die entsprechenden Lymphozyten oder NK-Zellen wurden zentrifugiert (1500g, 10min, RT), der Überstand bis auf 50µl verworfen und das Pellet mit 2,5µl des entsprechenden Antikörpers markiert. Nach 30minütiger Inkubation bei RT im Dunkeln konnte gemessen werden. Als Negativkontrolle und zur Parametereinstellung am Durchflusszytometer diente der Multi Mix™ Triple-Colour Control Reagent. Verwendet wurde ein 5-Kanal-Durchflusszytometer vom Typ DAKO Galaxy. Die Messungen und Auswertungen wurden mit der Partec Flow Max-Software durchgeführt.

### **4.6.2 Expression von CD160, CD56, CD16 und CD3**

Für die Messung der Expression der Oberflächenrezeptoren wurden Lymphozyten und NK-Zellen aus peripherem Blut als auch aus der Dezidua verwendet. Die Zellen wurden nach der Isolation direkt nach Versuchsanordnung aufgeteilt und wie oben beschrieben mit Oberflächen-antikörpern markiert.

#### 4.6.3 Expression zytotoxizitäts-assoziiierter Proteine

Für diese Versuchsreihe wurden NK-92 Zellen von anderen Mitarbeitern mit siRNA transfiziert um die Expression der Proteine STAT3 bzw. SOCS3 auszuschalten. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit der nicht-genomischen STAT3-siRNA transfiziert wurden.

Die Zellen wurden drei weitere Tage kultiviert und 12h vor dem jeweiligen Versuch gewaschen und in frischem Medium ohne Zugabe von IL-2 aufgenommen.

Um die Expression von intrazellulären Proteinen wie Perforin, GranzymB und Granulysin zu messen, müssen die Zellen zunächst fixiert und dann mit Saponin permeabilisiert werden. Dazu wird das Zellpellet in 4%igem Paraformaldehyd resuspendiert, gevortext und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgen 2 Waschschrte mit PBS und Zentrifugation für jeweils 5min bei 1500g bevor die Zellsuspension für 30min bei Raumtemperatur in 200µl Saponin-Waschpuffer inkubiert wird. Nach Abzentrifugation (1500g, 5min) werden den Zellpellets je 10µl intrazellulärer Antikörper und 200µl Saponin Waschpuffer zugegeben. Nach 30min Inkubation bei Raumtemperatur kann abzentrifugiert (1500g, 5min) und in 100µl PBS am FACS gemessen werden.

#### 4.6.4 Expression von IL-6 und VEGF

Zur Bestimmung der IL-6 und VEGF-Expression auf NK-Zellen musste sowohl intrazellulär als auch auf der Oberfläche markiert werden. Es wurden die Zellen von der Biopsieentnahme aus dem Endometrium untersucht.

Das Zellpellet (50µl) wurde mit 2,5µl anti-CD56 Antikörper (PE) für 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde in PBS gewaschen, zentrifugiert (1500g, 10min) und in 100µl RPMI-Medium resuspendiert. Um die Sekretion zu stimulieren, die Calcium Freisetzung anzutreiben und die Proteinfreisetzung zu blockieren wurde die Zellsuspension mit 1% BrefeldinA, 0,001% PMA und 1µM Ionomycin versetzt und für 4 Stunden im Dunkeln inkubiert. Nach 2 Waschschrten mit PBS (s.o.) wurde das Zellpellet mit 100µl 4%Paraformaldehyd für 20min im Dunkeln fixiert. Ein weiterer Waschschrte wie zuvor folgte bevor mit Saponin-Waschpuffer für 30min inkubiert wurde. Danach wurde wieder gewaschen und die 50µl Zellsuspension mit 2,5µl anti-VEGF (FITC) bzw. mit anti-IL-6 markiert. Nach 30minütiger Inkubation im Dunkeln wurde mit PBS gewaschen, schließlich 100µl der Zellsuspension am FACS gemessen.

## **4.7 Serumanalyse**

Am Tag der Biopsieentnahme wurde für den Vergleich am Durchflusszytometer auch peripheres Blut entnommen. Das Serum wurde zudem für die Bestimmung von Hormonen (E2, P4) und Zytokinen (IL-6, VEGF) verwendet.

## **4.8 Biopsieentnahme aus dem Endometrium und Präparation der Biopsien**

### **b) Versuche zu antioxidativen und immunmodulatorischen Zusammenhängen**

Die Biopsieentnahmen aus dem Endometrium wurden mit einer 2mm-Pipette von Cornier oder Novak von einem Gynäkologen durchgeführt, jeweils 5-7 Tage nach dem Eisprung. Unter sterilen Bedingungen wurde das Gewebe in 2ml Reagenzgefäße nach Eppendorf transferiert, die jeweils 1ml RPMI-Medium mit 10% humanem AB-Serum enthielten.

Für die Zell- und Zytokinanalyse mit dem Durchflusszytometer wurde das Gewebe steril mit einem Homogenisierer zerkleinert und in ein steriles 15ml Falcon-Röhrchen gegeben. Zur Lyse der Erythrozyten wurde zentrifugiert (1500g, 7min) und das Zellpellet in 1ml destilliertem Wasser aufgelöst. Nach 30 Sekunden wurde der Vorgang mit PBS gestoppt und das Zellpellet nach Zentrifugation (1500g, 7min) in komplettem RPMI-Medium resuspendiert.

### **c) Versuche zu apoptotischen Prozessen bei Abort gefährdeten Patienten**

Durch Biopsieentnahme mit einer sterilen 4mm Kanüle und einer Vakuumspritze (AMIU, Semina) wurden die Proben aus dem Endometrium gewonnen. Das erhaltene Fragment wurde geteilt und ein Teil in einen 50ml Falcon mit 40ml 10%iges Formaldehyd (Merck) gegeben. Der andere Teil wurde in 10ml DMEM:F12 Medium (Gibco) mit Penicillin (100U/mL), Streptomycin (100µg/mL) (Gibco Life Technologies) und AmphotericinB (200µg/mL) (Cultilab) bei 37°C inkubiert.

Alle Biopsieentnahmen wurden in der ersten Phase des Reproduktionszyklus der Probanden durchgeführt.

## **4.9 Fixierung und Dehydrierung der Proben des Endometriums**

Das aus dem Endometrium durch Biopsieentnahme gewonnene Fragment wurde sofort in einer 10%igen Formaldehyd-Lösung für 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde makroskopisch begutachtet und die in Seidenpapier eingewickelte Probe in einer histologischen Kassette aufbewahrt.

Die Kassetten mit den Proben wurden für die Dehydrierung in einen Prozessor (Leica) gegeben. Dieser Vorgang dauerte etwa 20 Stunden und beinhaltete die folgenden Bäder-Sequenzen: 1% Formaldehyd, 60% Alkohol, 70% Alkohol, 80% Alkohol, 90% Alkohol I, 90% Alkohol II, 100% Alkohol I, 100% Alkohol II, Xylen I, Xylen II, Paraplast I und Paraplast II.

## **4.10 Paraffin-Einbettung und Aufbereitung der Objektträger**

Nach der Dehydrierung kam das Material, das zuvor in geeignete Metallkassetten für die Einbettung verlagert wurde, in den erhitzten Bereich der histologischen Bearbeitungsplatte (Leica) und wurde bei hohen Temperaturen mit flüssigem Paraplast überschichtet. Daraufhin wurden die Kassetten über den kühlen Bereich der Platte entfernt, wo sie für ungefähr eine Stunde zur Erstarrung und Formung zu Blöcken für den Dünnschnitt blieben.

Die Schnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom von Leica (RM 2145) gemacht, wo die Schnittdicke auf 4 Mikrometer eingestellt war. Die Blöcke wurden für mindestens 30min mit Eis gekühlt um einen vollständigen Schnitt ohne Risse zu erhalten.

Jeder Schnitt wurde direkt vom Mikrotom in ein Wasserbad gebracht (42°C), mit der glänzenden Fläche unter Wasser. Die Inkubationszeit wurde durch die vollständige Ausdehnung des Gewebes bestimmt um die Falten zu glätten und betrug etwa 10 Minuten. Anschließend wurde das Material auf einen beschichteten Objektträger (Dako) gebracht und im Brutschrank bei 37°C für etwa 48h zur Trocknung und vollständigen Anhaftung inkubiert.

## **4.11 Hematoxilin-Eosin Färbung**

Zunächst muss das Paraffin auf den Objektträgern entfernt werden. Dazu wurden sie im Brutschrank bei 57°C für eine Stunde inkubiert. Danach wurden sie für jeweils 3 Minuten in folgende Lösungen getaucht: 2 Mal in Xylen, 100% Alkohol, 90% Alkohol, 80% Alkohol, 70% Alkohol und destilliertes Wasser. Anschließend wurde 1 Minute mit Hematoxilin gefärbt, mit destilliertem Wasser gewaschen und noch 15 Sekunden mit Eosin gefärbt.

Nach diesem Vorgang wurde der Dünnschnitt dehydriert: zu je 5 Minuten in 70%igem Alkohol, 80%igem Alkohol, 90%igem Alkohol und 100%igem Alkohol. Eine bessere Durchsicht wurde mit anschließenden Xylenbädern erreicht: 2 Mal für je 3 Minuten. Schließlich wurden 2 Tropfen des Klebemittels Entelan (Merck) auf den Schnitt gegeben und vorsichtig das Deckgläschen darauf angebracht.

## **4.12 Immunhistochemische Reaktion zur Detektion von Bcl-2**

Es wurde der monoklonale IgG-Antikörper anti-NCL-bcl-2 von Novocastra verwendet. Es wurden verschiedene immunhistochemischen Protokolle getestet um die geeignetste Technik für dieses Projekt herauszufinden. Außer den Proben des Endometriums verwendeten wir als Positivkontrollen noch Schnitte der Tonsille, wie von dem Hersteller empfohlen. Alle immunhistochemischen Versuche wurden mit einer Negativkontrolle durchgeführt, indem der erste Antikörper durch die Pufferlösung Tris 0,01M ersetzt wurde.

Nach dem Vorgang der Deparaffinisierung und der anschließenden Waschschrte, kamen die Objektträger in einen Glasbehälter mit der Pufferlösung Tris 0,01M, pH 7,4 und wurden dann in der Mikrowelle bei maximaler Stärke für 2 Mal 10 Minuten erhitzt. Daraufhin kühlten sie auf natürlichem Wege, eingetaucht in die Pufferlösung, bei Raumtemperatur, in etwa 20 Minuten ab.

Der Dünnschnitt wurde mit 1%igem Hydrogenperoxid (60ml destilliertes Wasser + 2ml 30% oxigeniertes Wasser) für 30 Minuten benetzt um die endogenen Peroxidase zu blockieren. Anschließend wurden die Objektträger für 5 Minuten in 0,01M TBS Puffer gewaschen und mit 1% BSA (Kälberserum, Sigma), verdünnt in 0,01M Tris Puffer für 30 Minuten versetzt. Dadurch wurden die Antigenstellen blockiert und unspezifische Färbungen verhindert.

Der primäre, monoklonale IgG Antikörper anti-APO-1/Fas von camundongo wurde 1:50 in 1%igem BSA/Tris verdünnt. Der Schnitt wurde mit diesem verdünnten Antikörper überschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Nach 2 weiteren Waschschritten für jeweils 5 Minuten in 0,01M TBS Puffer wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit dem sekundären, Biotin-konjugierten IgG-Antikörper (DakoCytomation, LSAB<sup>+</sup> System-HRP, Dako) inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff wie zuvor beschrieben, bevor mit Streptavidin (DakoCytomation, LSAB<sup>+</sup> System-HRP, Dako) für 20 Minuten inkubiert wurde.

Um die Reaktion zu starten wurde das Fragment für 1 Minute mit DAB (Dako) überschichtet. Gestoppt wurde die Reaktion mit destilliertem Wasser. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hematoxilin für ebenfalls 1 Minute. Danach wurde mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 70%, 80%, 90%, 100% Alkohol und Xylen dehydriert und geklärt. Zum Schluss wurde das Deckgläschen mit dem Klebemittel Entellan (Merck) angebracht.

#### **4.13 Immunohistochemische Reaktion zur Detektion von Bax**

Es wurde nach dem selben Schema wie für die Bcl-2-Detektion vorgegangen. Wir verwendeten den poliklonalen, IgG-Antikörper vom Kaninchen gegen das humane Bax Molekül (Dako). Als Positivkontrolle dienten Schnitte von einem Mammarkarzinom.

Anstelle der Mikrowelle wurde ein Dampfdrucktopf mit Zitratpuffer, pH 6,0 verwendet, worin die Objektträger für 2 Minuten unter Druck kochten. Das weitere Vorgehen geschah wie zur Bcl-2 Detektion.

#### **4.14 Färbung der Bcl-2, Bax und FasL –Antigene**

Für die Markierung des Fas-Liganden und der Bax Antigene wurden die Träger für 1,5min mit 0,2M Citratpuffer in einem Dampfdrucktopf gekocht, während die Träger für die Bcl-2 Bestimmung drei Mal für 5min, 2min und 2min in der Mikrowelle erhitzt wurden. Mit der Inkubation in 3%igem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 10min, 3 Mal, wurde die endogene Peroxidase Aktivität gestoppt. Gespült wurde anschließend in TBS. Um unspezifisches Anfärben zu verhindern, wurde in 1% Albumin (Sigma) für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht mit einem Fas Ligand Antikörper (1/50,

Labaratories Novocastra<sup>TM</sup> ), einem Bcl-2 Oncoprotein-Antikörper (1/200, Labarotories Novocastra<sup>TM</sup> ) oder einem Bax-Antikörper (1/200, DakoCytomation), bzw. nur mit TBS als Negativkontrolle, wurde in TBS gewaschen und Biotin (LSAB<sup>+</sup> System-AP, DakoCytomation) für 20min aufgetragen. Ein weiterer Waschschrift mit PBS folgte. Danach wurden die Träger für 30 min (Bax and Bcl-2) bzw. für 40min (Fas Ligand) mit Streptavidin (LSAB<sup>+</sup> System-AP, DakoCytomation) überschichtet und nochmals in TBS gewaschen. Mit 3,3'-diaminobenzidin (DAB, DakoCytomation) kommt es zur chromogenen Reaktion, die unter dem Lichtmikroskop beurteilt und mit destilliertem Wasser gestoppt wird. Die Schnitte werden schliesslich mit Hematoxylin gegengefärbt, bevor ein Deckglas angebracht und sie unter dem Lichtmikroskop evaluiert werden.

### **4.15 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse**

Die Messungen am Durchflusszytometer und die Auswertung der Daten wurden mit dem Programm „Cell Quest Pro“ durchgeführt. Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Daten erfolgten mit MS Excel. Mittelwerte und Standardfehler wurden berechnet und die Ergebnisse der numerischen Tests in Balkendiagrammform dargestellt. Für die statistische Analyse wurde der T-Test für gepaarte Stichproben und der Test für ungepaarte Stichproben verwendet. Die Ergebnisse wurden für  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet.

Für die histologischen Untersuchungen wurden repräsentative Objektausschnitte abgebildet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Expression von CD160 auf NK-Zellen

Nachdem bereits ein Unterschied in der Funktionsweise von peripheren und uterinen NK-Zellen vermutet wird (siehe Einleitung), sollte dies anhand von Unterschieden in der Morphologie und der Rezeptorexpression dieser beiden Zelltypen weiter bestätigt werden. Dazu sollte in diesem Versuch festgestellt werden, inwieweit der CD160-Rezeptor mit seinem zytotoxischen Potenzial auf peripheren NK-Zellen auch auf uterinen NK-Zellen exprimiert wird. Mittels Fluoreszenz-markierten Antikörpern und Durchflusszytometer wurde das Expressionslevel über die Fluoreszenzintensität auf peripheren (a) und dezidualen(b) Lymphozyten, T- und NK-Zellen bestimmt und miteinander verglichen (c) (siehe Abb.5, 6 und 7).

a) Peripheres Blut:

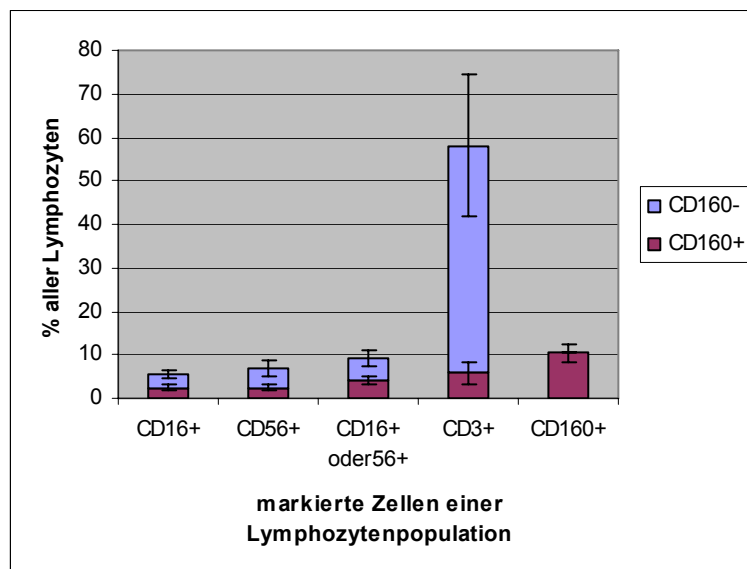


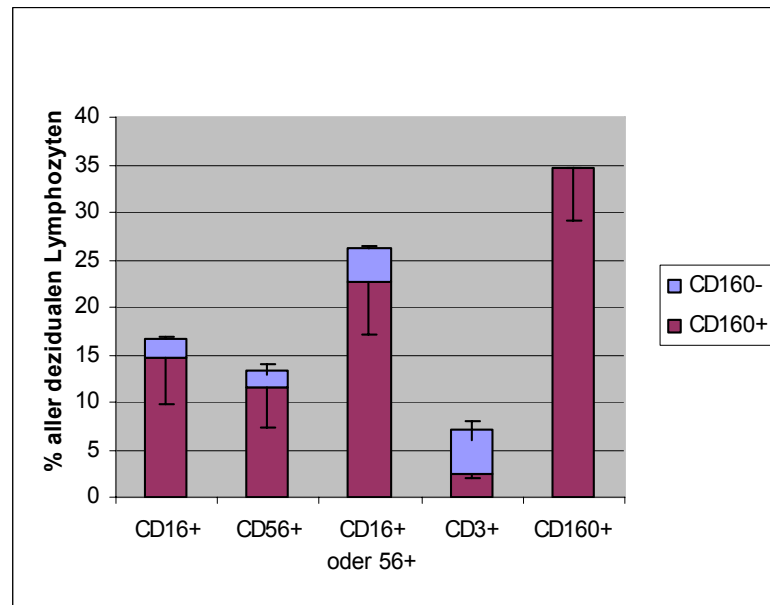
Abbildung 5: **Rezeptorexpression von CD160 auf peripheren Lymphozyten.**

Es wurde die Verteilung von CD160 auf die Zellsubpopulationen NK- und T- Zellen bei Frauen nach unauffälligem Schwangerschaftsverlauf untersucht. Die entsprechenden Standardfehler wurden von 3 unabhängigen Versuchen berechnet.

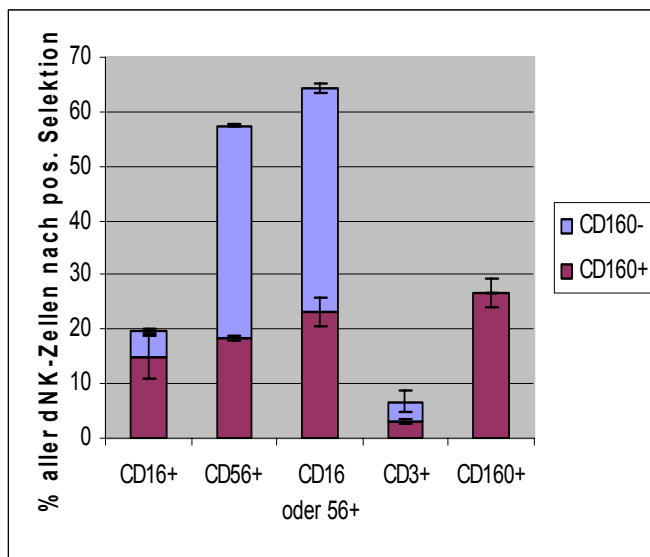


b) Dezidua:

I.



II.



III.

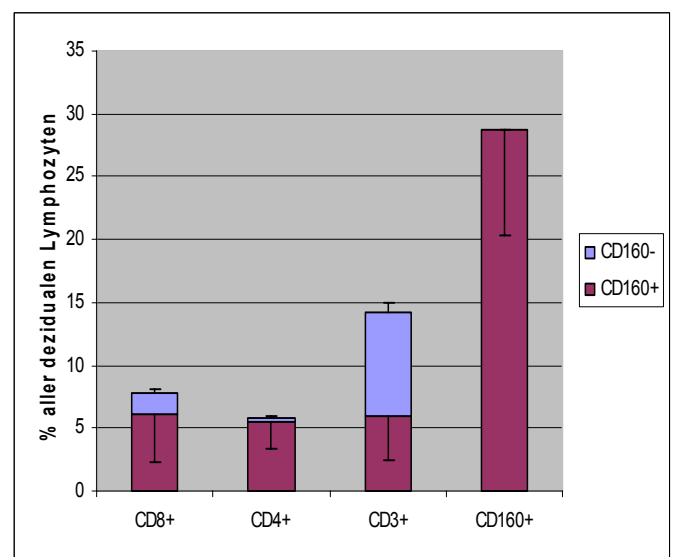


Abbildung 6: Expression von CD160 auf dezidualen Lymphozyten (I.), dezidualen NK-Zellen (II.) und dezidualen T-Zellen (III.).

Untersucht wurde auch die Verteilung auf die entsprechenden Subpopulationen CD16 und CD56, bzw. CD4 und CD8. Die jeweiligen Standardfehler wurden nach 2 (II. und III.) bzw. 3 (I.) unabhängigen Versuchen berechnet.

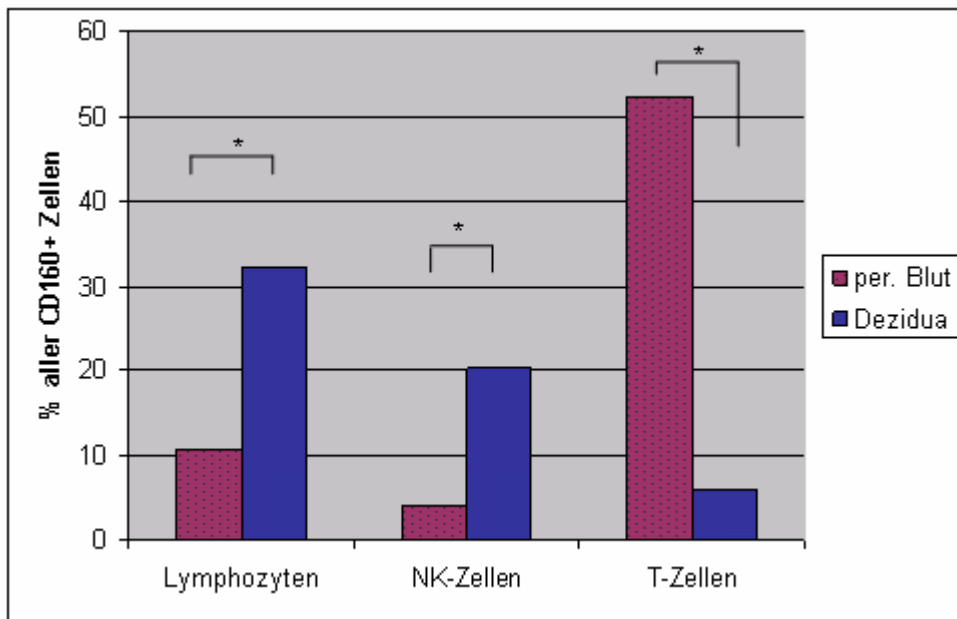


Abbildung 7: **Vergleich der CD160-Expression von Lymphozyten, NK- und T-Zellen des peripheren Blutes und der Dezidua.**

Die Unterschiede wurden bei  $*p < 0,05$  als signifikant betrachtet. Mit dem Student's T-Test wurden sie aus jeweils 3 unabhängigen Versuchen berechnet.

Die CD160 Expression konnte sowohl auf Lymphozyten des peripheren Blutes als auch auf den Lymphozyten der Dezidua nachgewiesen werden. Quantitativ gab es signifikante Unterschiede mit vermehrter CD160 Expression der dezidualen Lymphozyten. Dabei produzieren auch die dezidualen NK-Zellen CD160, ebenfalls zu einem signifikant größeren Anteil als die peripheren NK-Zellen (vergleiche Abbildung 7). In beiden Fällen produzieren sowohl  $CD16^+$  als auch  $CD16^-$  NK-Zellen ohne deutlich prozentuale Unterschiede CD160.

Neben den NK-Zellen produzieren auch  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zellen CD160. Während die T-Zellen im peripheren Blut den Hauptanteil an CD160 exprimieren, produzieren in der Dezidua die NK-Zellen einen größeren Anteil an CD160 (vergleiche Abbildung 7).

## 5.2 Zytotoxizität im Zusammenhang mit der Expression Zytotoxizitäts-assoziiierter Proteine

Neben den Rezeptoren, über die die NK-Zellen funktionell reguliert werden, lassen auch die Granula mit ihren Zytotoxizitäts-assoziierten Proteinen Rückschlüsse auf die Funktionen dezidualer NK-Zellen zu.

Ziel folgender Experimente war es, deziduale NK-Zellen mit ihrem deutlich anderen Funktionsprofil auf diese Granula bzw. Zytotoxizitäts-assoziierten Proteine zu untersuchen. Im Zusammenhang mit den Zytotoxizitäts-regulierenden Faktoren IL-2, IL-15 und HLA-G1s sowie den SOCS3- und STAT3-Molekülen, wurde untersucht, inwieweit diese ihre Wirkung über die Expression der Zytotoxizitäts-assoziierten Proteine GranzymB, Perforin und Granulysin entfalten. Um zuerst die Methode zu etablieren, wurde mit der Zelllinie NK-92 gearbeitet, die drei Tage zuvor mit siRNA zum Ausschalten der Expression der STAT3 und SOCS3 - Moleküle transfiziert wurde. 48 Stunden vor der Analyse der Protein-Expression mittels Durchflusszytometer erfolgte die Stimulation mit HLA-G und IL-15. Das jeweilige Expressionslevel wurde anhand der Fluoreszenzintensität bestimmt.

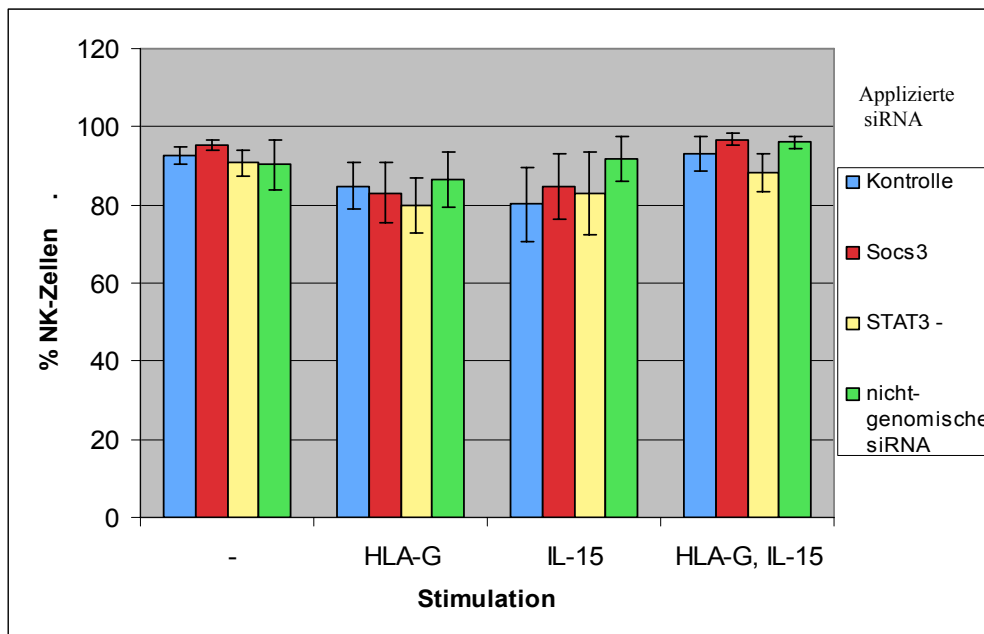


Abbildung 8: **Expression von Granzym B** nach dem „Knock-down“ von STAT3 und SOCS3. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit nicht-genomischer siRNA transfiziert. Die Standardfehler wurden aus Daten von vier unabhängigen Experimenten berechnet. Teilweise wurden Extremwerte unter Annahme von Fehlmessungen von der Wertung ausgeschlossen.

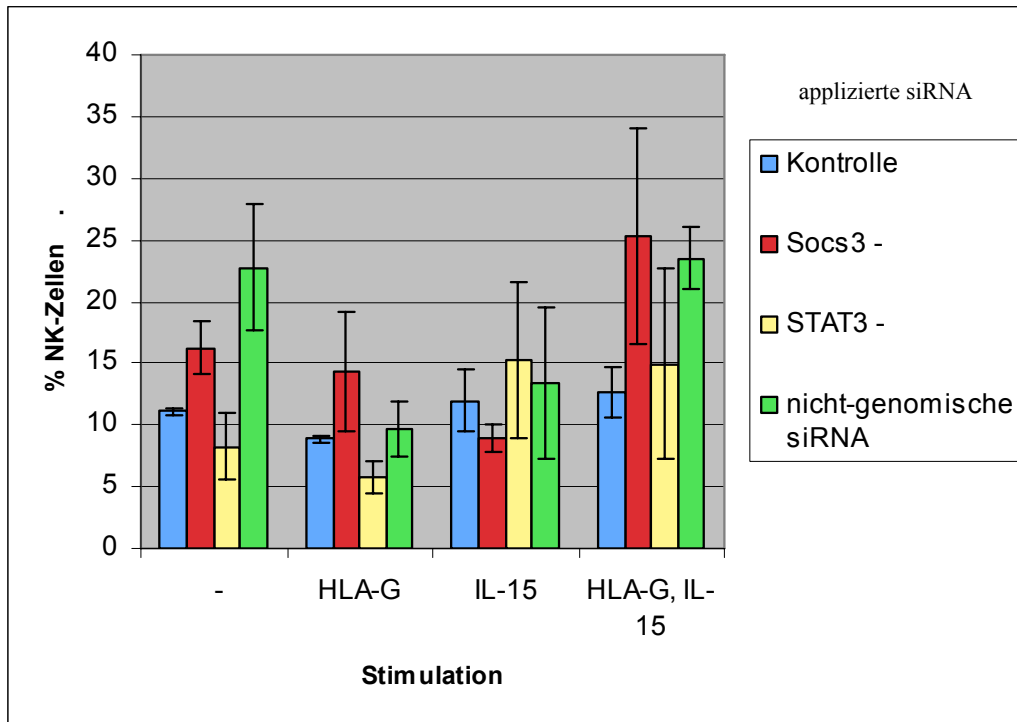


Abbildung 9: **Expression von Granulysin** nach dem Knock-down von STAT3, SOCS3 und nicht-genomischer siRNA als Kontrolle. Die Standardfehler wurden aus Daten von zwei unabhängigen Experimenten berechnet. Zwei weitere Versuche wurden durchgeführt und wegen extrem niedriger Werte aber nicht dokumentiert, zeigten aber tendenziell ähnliche Ergebnisse.

Die Transfektion mit der STAT3 siRNA hat keine signifikanten Auswirkungen auf die Expression von GranzymB und Granulysin in dem von uns beobachteten Zeitraum. Unter Ausschaltung von SOCS3 dagegen findet man eine überwiegend erhöhte Granulysin-Expression. Die Mehr-Expression gegenüber STAT3 ist unabhängig vom Stimulus in 7 von 8 Proben vorhanden, allerdings bleibt der Unterschied nicht signifikant. Die nicht-genomische siRNA bewirkt eine leichte Verstärkung der GranzymB- und Granulysin-Expression (siehe Abbildungen 8 und 9).

Die Messwerte für die Expression von Perforin sind nicht dargestellt. Sie lagen für alle Proben unterhalb der Nachweisgrenze.

Hinsichtlich der HLA-G und IL-15 Stimulation ergaben sich keine Unterschiede im Vergleich zu den unstimulierten Proben.

### 5.3 Einflüsse auf Anzahl und Verteilung zytotoxischer und regulatorischer NK-Zellen in der Dezidua

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, unterscheiden sich deziduale NK-Zellen von den NK-Zellen des peripheren Blutes in vieler Hinsicht, unter anderem im Verhältnis der NK-Zell Subpopulationen. Im folgenden Versuch sollen Faktoren untersucht werden, die dieses Verhältnis beeinflussen und so möglicherweise auch bei pathologischen Prozessen eine Rolle spielen könnten.

Dazu wurden Gewebeproben aus dem Endometrium von Frauen untersucht, die zuvor mit GnRH stimuliert wurden und mit einer Kontrollgruppe verglichen. In beiden Fällen gab es Biopsieentnahmen im Implantationsfenster und nach einer lokalen Verletzung während des Ovulationsfensters. Das Verhältnis der NK-Zell Subpopulationen wurde mittels Durchflusszytometer von Lymphozyten des peripheren Blutes und aus Biopsieentnahmen aus dem Endometrium bestimmt. Zusätzlich wurden Zytokinkonzentrationen über ELISA bestimmt.

#### 5.3.1 Der Einfluss über die Stimulation von Ovarien

Bei einer Stimulation der Ovarien fand man eine signifikante Abnahme des NK-Zell homing ins Endometrium (siehe Abb.10), sowie eine signifikante Zunahme der Progesteron Konzentration (siehe Abb.11). Der Vergleich der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ergab bei GnRH Stimulation eine Verschiebung zugunsten der zytotoxischen CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (siehe Abb.12).

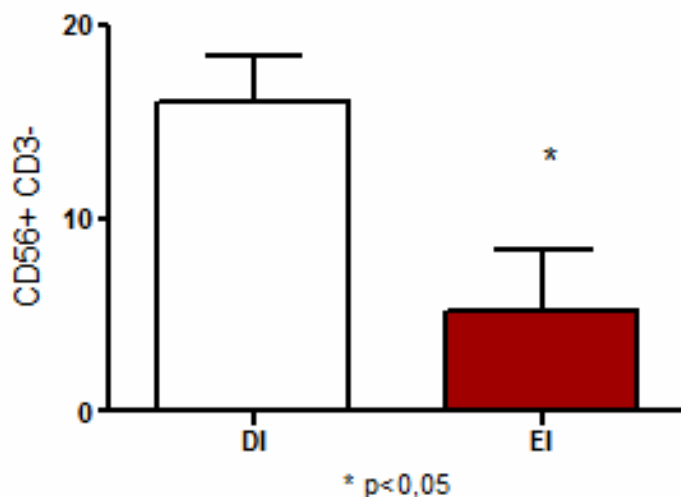


Abbildung 10: Auswirkungen einer Stimulation der Ovarien auf das NK-Zell homing

EI stellt die Patientengruppe dar, die mit GnRH stimuliert wurde, während DI die für die Kontrollgruppe stand. Beide Gruppen bestanden aus jeweils 20 Patientinnen. Mit dem Test für ungepaarte Stichproben wurde die Signifikanz für  $p < 0,05$  berechnet.

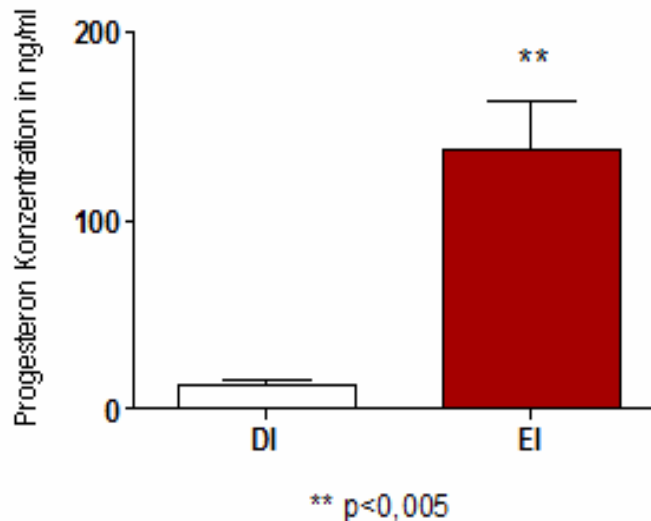


Abbildung 11: **Auswirkungen einer Stimulation der Ovarien auf die Progesteron Konzentration im Serum**

EI stellt die Patientengruppe dar, die mit GnRH stimuliert wurde, während DI die für die Kontrollgruppe stand. Beide Gruppen bestanden aus jeweils 20 Patientinnen. Die mit dem Test für ungepaarte Stichproben berechnete Signifikanz entsprach bei  $p<0,005$ .

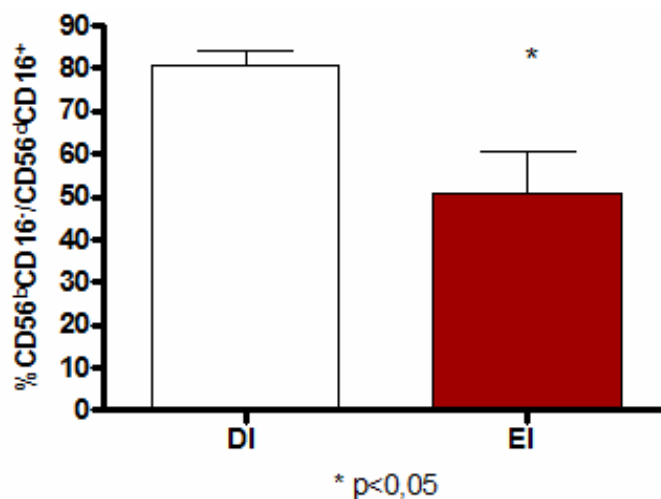


Abbildung 12: **Auswirkungen einer Stimulation der Ovarien auf das Gleichgewicht der NK-Zellen**

Verglichen wurde das NK-Zell Verhältnis im Endometrium von fertilen Frauen im natürlichen Zyklus (DI) und im stimulierten Zyklus (EI) mit jeweils 20 Patientinnen. Es wurde der Test für ungepaarte Stichproben mit einer Signifikanz für  $p<0,05$  angewandt.

CD56d: CD56<sup>dim</sup>; CD56b: CD56<sup>bright</sup>

### 5.3.2 Der Einfluss einer lokalen Verletzung endometrialen Gewebes

Eine lokale Verletzung des Endometriums durch Biopsieentnahme hat den Einfluss der GnRH Agonisten auf das NK-Zellverhältnis nicht verändert (siehe Abb.13).

Unter GnRH Stimulation führt eine lokale Verletzung des Endometriums zu einer erhöhten VEGF Konzentration im Endometrium (siehe Abb.14).

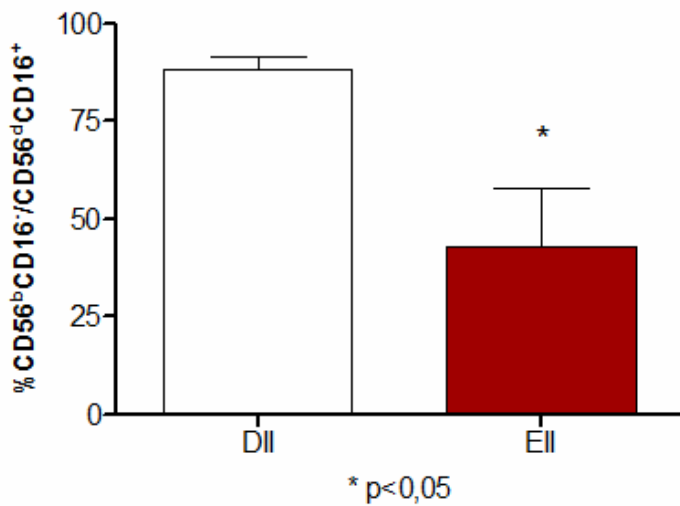


Abbildung 13: **Auswirkungen einer lokalen Verletzung auf das Gleichgewicht von NK-Zellen**

Verglichen wurde das Verhältnis der NK-Zell Subpopulationen im Endometrium von je 20 fertilen Frauen mit lokaler Verletzung im natürlichen Zyklus (DII) und im stimulierten Zyklus (EII) nach vorangegangener Biopsieentnahme. Es wurde der Test für ungepaarte Stichproben mit Signifikanz bei  $p < 0,05$  angewandt.

CD56d: CD56<sup>dim</sup>; CD56b: CD56<sup>bright</sup>

(a)

(b)

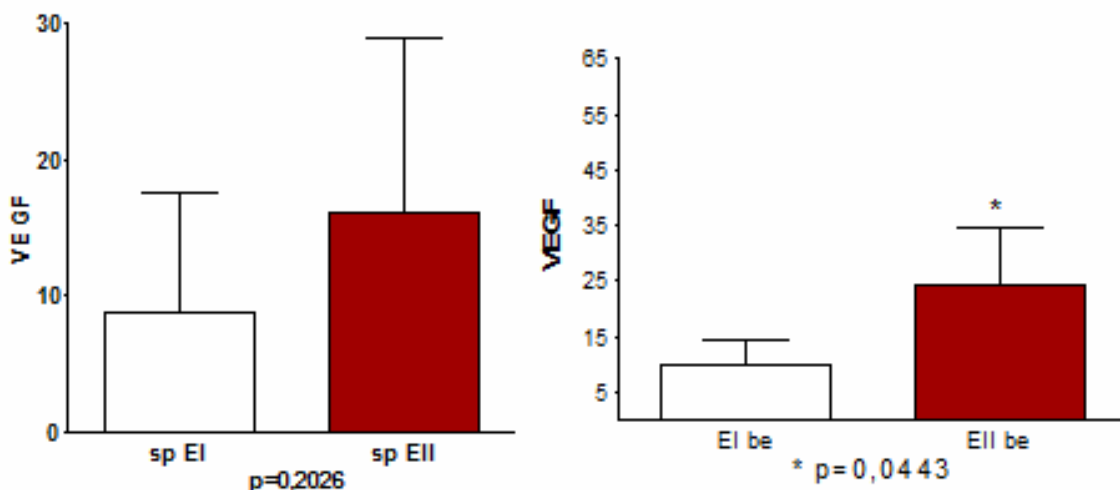


Abbildung 14: **Auwirkungen einer lokalen Verletzung auf die VEGF Konzentration** im peripheren Blut (a) und im Endometrium (b)

20 Frauen im stimulierten Zyklus wurden ohne (EI) und mit (EII) vorangegangener Biopsieentnahme untersucht. Die Signifikanz wurde mit dem Test für gepaarte Stichproben berechnet und für  $p < 0,05$  angenommen.

Sp: peripheres Blut; be: Biopsieentnahme aus dem Endometrium

### 5.3.3 Der Zusammenhang mit immunregulatorischen Zytokinen am Bsp. von IL-6

Während sich Zusammenhänge zwischen der IL-6 und Östradiol Konzentration vermuten lassen, stellt sich die Konzentration an CD56<sup>bright</sup>-Zellen unabhängig von der IL-6 Konzentration dar (vergleiche Abb.15 a und b).

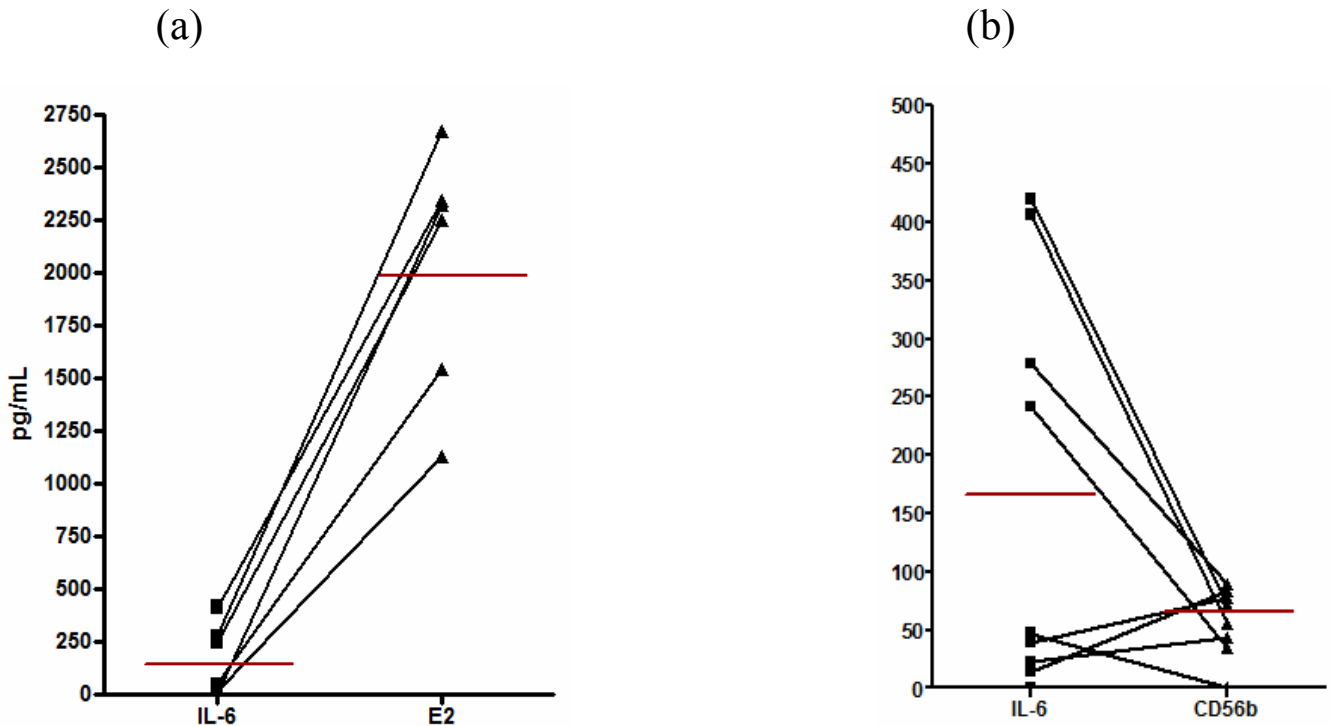


Abbildung 4.15: Zusammenhang der IL-6 und Östradiol (a) Konzentrationen bzw. der Konzentration der CD56<sup>bright</sup> Zellpopulation (b).

Die Werte wurden für 40 Frauen im stimulierten und natürlichen Zyklus bestimmt.

E2: Östradiol; CD56b: CD56<sup>bright</sup>; IL-6: Interleukin 6

Eine Stimulation der Ovarien führt zu einem signifikanten Unterschied des Verhältnisses der dezidualen NK-Zellpopulationen im Zeitfenster der Implantation (vergleiche Abb.12). Dies ist auf eine Zunahme zytotoxischer und eine Abnahme angiogener NK-Zellen im Endometrium zurückzuführen. Eine lokale Verletzung konnte diesen hormonalen Effekt nicht kompensieren (vergleiche Abb.13).

Des Weiteren bewirkt eine Stimulation der Ovarien eine Erhöhung der Progesteron Konzentration im Serum um bis zu 100fach (vergleiche Abb.11). Dieser Effekt steht in Verbindung mit einer Abnahme der gesamten CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> Zellpopulation im Endometrium. Andererseits erhöhten die Stimulation der Ovarien und die lokale Verletzung die VEGF Konzentration im Endometrium (vergleiche Abb.14).



## **5.4 Die Rolle von NK-Zellen im Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen bei wiederholten Spontanaborten**

NK-Zellen haben zytotoxisches Potenzial und sind von daher in der Lage apoptotische Prozesse auszulösen. Da bereits nachgewiesen wurde, dass sich deziduale NK-Zellen in ihrer Anzahl und ihrem Verteilungsmuster, sowie ihrer zytotoxischen Funktion bei pathologisch verlaufenden Schwangerschaften verändern, sollte nun auch die Auswirkung auf Apoptosevorgänge bei Patienten mit bereits mehreren Aborten untersucht werden.

Dazu wurden Biopsieentnahmen aus dem Endometrium mittels Immunchemie auf pro- (Bax) und anti- (Bcl-2) apoptotische Moleküle untersucht.

### **Beurteilung der Morphologie des Endometriums**

Die Proben aus dem Endometrium der Kontrollgruppe und der Gruppe mit wiederholten Spontanaborten wurden routinemäßig in Parafin eingebettet und nach Hematoxilin- und Eosinfärbung im Mikroskop begutachtet. Alle Proben stammten von Patienten, die sich in der proliferativen Zyklusphase befanden.

Im Lichtmikroskop wiesen alle Proben, unabhängig von der Gruppe welcher sie angehörten, ein relativ dünnes Endometrium auf, mit wenigen, schwach ausgeprägten Glandula, und ein Stromagewebe, das durch das Vorhandensein von Fibroblasten und wenigen Leukozyten gekennzeichnet war. In der Abbildung 16 sind Beispiele dieser speziellen Morphologie in der proliferativen Phase dargestellt.

Auch auf vaskulärer Ebene gab es keine Hinweise auf bestehende Pathologien. Sowohl die Spiralarterien als auch die subepithelialen Kapillaren und post-kapillaren Venen zeigten eine normale Morphologie, Dicke und Verteilung.

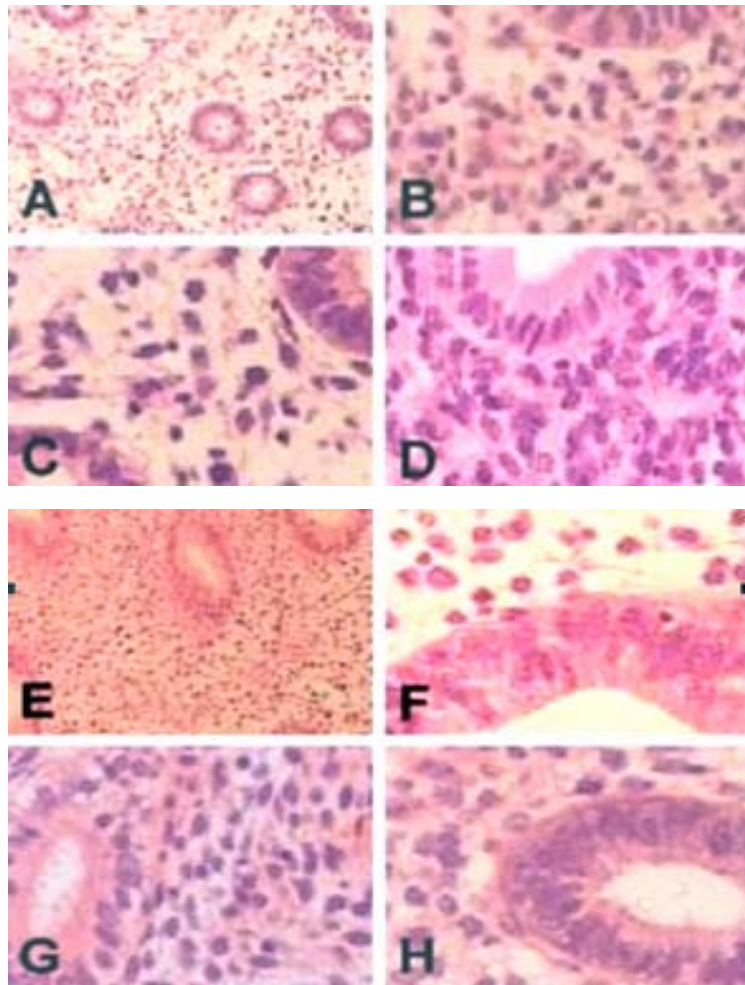


Abbildung 16: **Endometrium in der proliferativen Phase.**  
Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Hämatoxylin-Färbung  
mit jeweils 4 Probenbeispielen aus der Kontrollgruppe [A-D]  
und aus der Gruppe mit wiederholten Spontanaborten [E-H].

## Immunohistochemische Reaktionen für die Lokalisierung von Bax und Bcl-2 in Proben des Endometriums

### Bcl-2

In der Kontrollgruppe zeigte die immunohistochemische Lokalisierung von Bcl-2 in allen Proben eine gehäufte Aktivität von Bcl-2 in den Epithelzellen der uterinen Glandula (Abbildung 17). Nur gelegentlich wurden reaktive Zellen auch im Interstitium des Stromagewebes vom Endometrium gefunden.

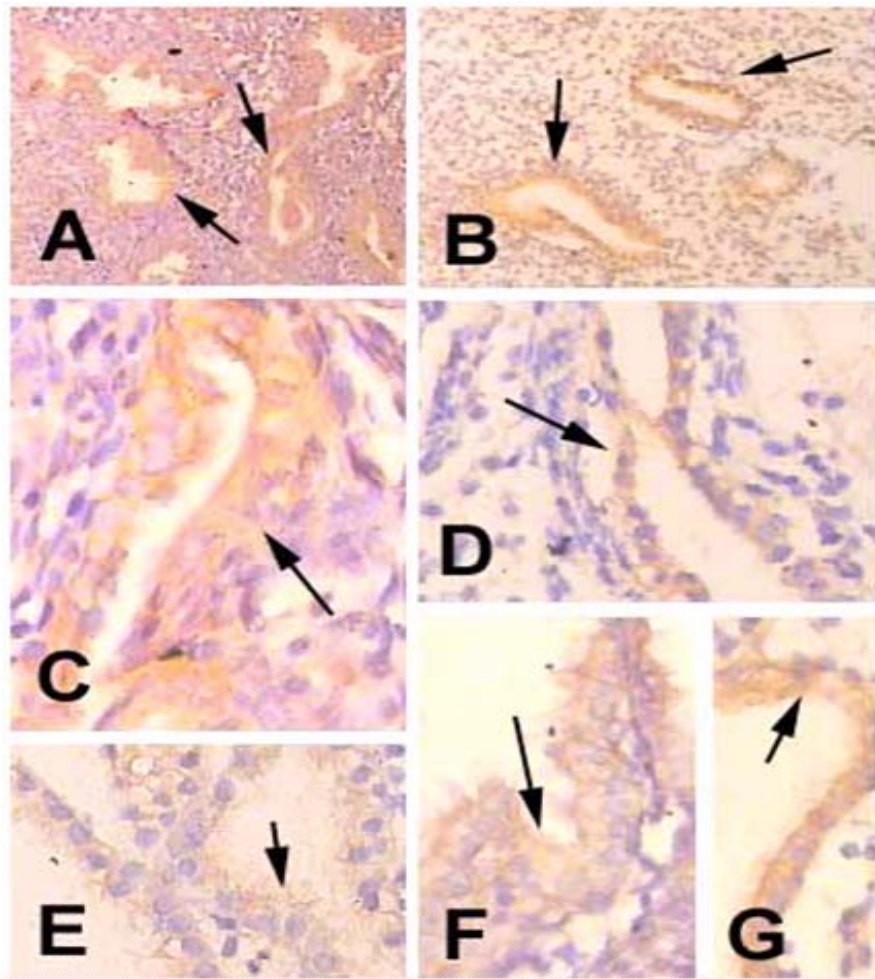


Abbildung 17: **Endometrium in der östrogenen Phase.** ..... Beispiele immunohistochemischer Reaktionen von Bcl-2 [A-G] bei der Kontrollgruppe. Beachte in allen dargestellten Proben die Aktivität in den uterinen Glandula (Pfeile).

Nach Vergleich an einer Norm fanden sich in der Patientengruppe Unterschiede zur Kontrollgruppe: Die Aktivität in den uterinen Glandula war deutlich schwächer (Abbildung 18) und in einigen Proben sogar negativ. Eine positive Aktivität in diesen Fällen wurde dagegen in Stromazellen des Endometriums entdeckt. Ein Teil dieser Zellen sind Fibroblasten.

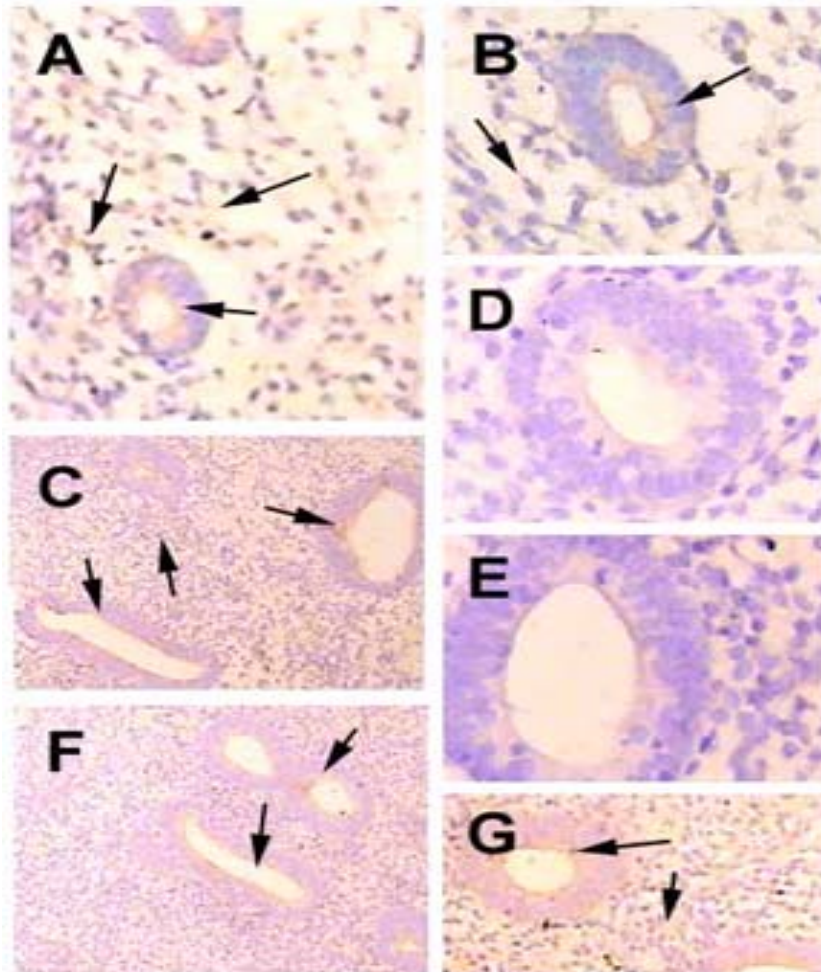


Abbildung 18: **Endometrium in der östrogenen Phase.**

Beispiele immunohistochemischer Reaktionen von Bcl-2 bei der Patientengruppe mit wiederholten Spontanaborten. [A-C, F-G] Beachte eine schwache Aktivität in den Zellen des Endometriums und der uterinen Glandula (Pfeile). Die Abbildungen D und E zeigen Beispiele mit unterschiedlichem Maßstab, in der keine Aktivität beobachtet wurde.



### Bax – Antikörper

Die Immunohistochemische Lokalisierung von Bax im Endometrium von Frauen der Kontrollgruppe zeigten in keiner Zellstruktur Aktivität. Uterine Glandula, Mantel- (Hüll-) Epithel, Stromagewebe des Endometriums und Blutgefäße zeigen keine positive Aktivität. (Abbildung 19).

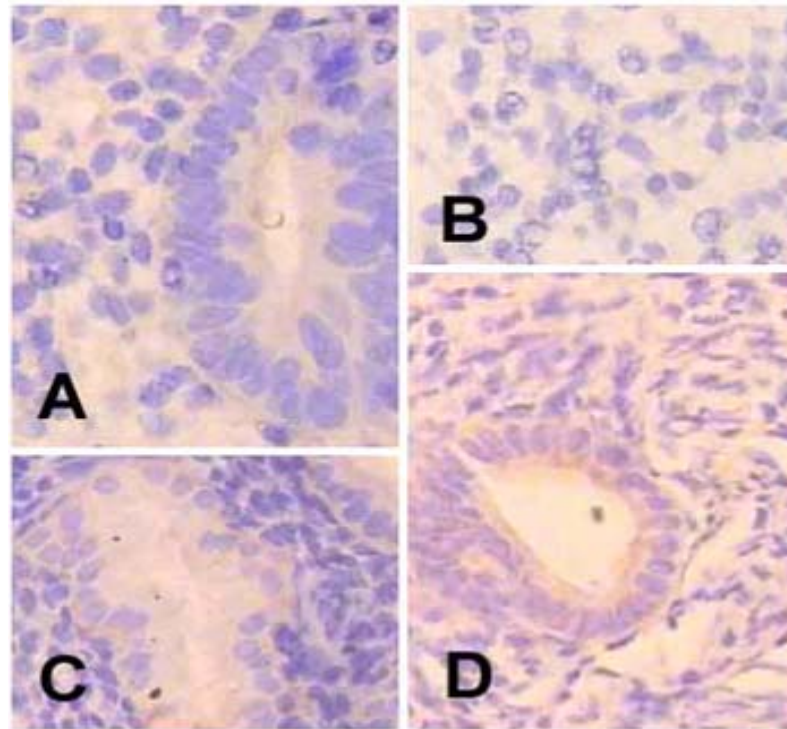


Abbildung 19: **Endometrium in der östrogenen Phase.**  
Immunohistochemische Reaktion von Bax bei der Kontrollgruppe.  
(A-D) Die Zellen zeigen keine Bax-Aktivität.

In den Proben der Frauen mit wiederholten Spontanaborten erkennt man bei 7 von 9 Proben eine diskrete Reaktivität im Epithel der Glandulae (siehe Abb.20). Keine andere Zellart des Endometriums zeigt eine relevante Aktivität.

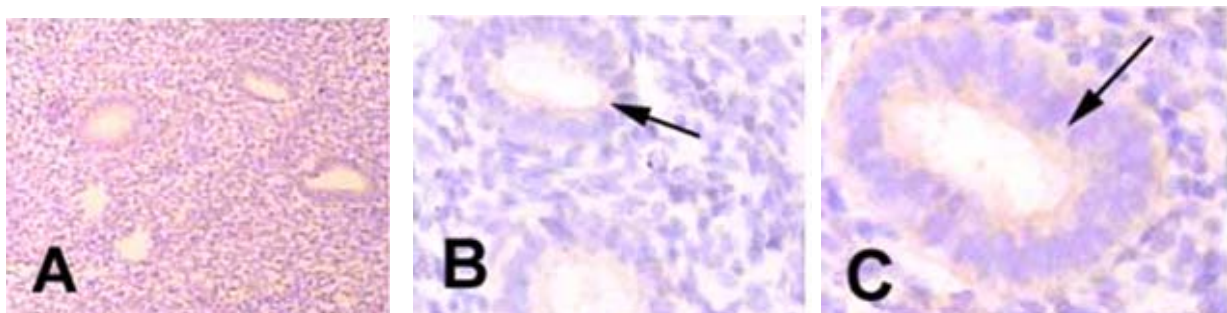


Abbildung 20: **Endometrium in der östrogenen Phase.** Immunohistochemische Reaktion von Bax bei Frauen mit wiederholten Spontanaborten. Beachte die Aktivität ausschließlich in den uterinen Glandula (Pfeile).

## 6. Diskussion

### 6.1 Regulation dezidualer NK-Zellen

Deziduale NK-Zellen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von den NK-Zellen des peripheren Blutes. Der überwiegend andere Phänotyp, der sie als CD16<sup>-</sup> und CD56<sup>+</sup> kennzeichnet, deutet bereits auf andere Funktions- und Regulierungsmechanismen hin, die im Mittelpunkt dieser Arbeit standen.

Es ist weitestgehend bekannt, dass der aktivierende Oberflächenrezeptor CD160 in Verbindung mit seinem Liganden HLA-C auf NK-Zellen und gewissen T-Zellen des peripheren Blutes zur Zytotoxizität führt (Le Bouteiller et al. 2002). Da HLA-C bzw. seine entsprechenden KIR-Rezeptoren besonders auch in der Dezidua exprimiert werden (Trowsdale et al. 2008), wurde das Vorkommen von CD160 auf dezidualen NK-Zellen untersucht. Dabei fanden sich sowohl auf dezidualen Lymphozyten als auch auf dezidualen NK-Zellen signifikant gesteigerte Expressionslevel dieses aktivierenden Rezeptors.

Unter Ausschluss von Fehlerquellen, die zum Beispiel durch eine andere und längere Aufbereitung des dezidualen Gewebes denkbar wären, könnten sich die Resultate folgendermaßen erklären lassen:

Da eine zytotoxische Funktion des CD160-Rezeptors in der Dezidua nicht sinnvoll erscheint, könnte er die NK-Zellen zu anderen Funktionen aktivieren. In der Tat wurden ihm auch schon Eigenschaften zur Förderung von Proliferation und Apoptose zugesprochen (Nikolova et al. 2002). Dies ist ein Hinweis darauf, dass deziduale NK-Zellen in ihrer Aktivität und zytotoxischen Eigenschaft nicht einfach inhibiert werden, sondern durchaus auch andere wesentliche Funktionen für die Implantation und Plazentation erfüllen. Es stellt sich nun die Frage, worin diese Funktion genau besteht.

Es gibt Untersuchungen zur Zytokinexpression nach CD160-Aktivierung bei peripheren Lymphozyten. Dabei fand man, dass das HLA-C Molekül über den CD160 Rezeptor sowohl zytotoxische Funktionen vermittelt als auch zu einer INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 Produktion der NK-Zellen führt (Barakonyi et al. 2004). Neben der zytotoxischen Eigenschaft dieser Zytokine könnten zusätzliche immunmodulierende Funktionen einen weiteren Erklärungsansatz dazu bieten.

## 6.2 Wirkungsweise dezidualer NK-Zellen

NK-Zellen wurden erstmals als zytotoxische Zellen der Immunabwehr bekannt, bevor weitere Funktionen für Implantation und Plazentation vermutet wurden. Dabei wiesen frühere Arbeiten darauf hin, dass in der Dezidua neben den Zytokinen IL-2 bzw. IL-15 das dort vorhandene nicht-klassische HLA-G1 Molekül einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat: Während die Zytokine stimulierend wirken, übt das HLA-G1s Molekül eine inhibierende Funktion auf die dNK-Zellen aus. (Poehlmann et al 2005)

Daneben wurde in früheren Beobachtungen ein Zusammenhang des Signaltransduktors STAT3 und dessen Negativregulator SOCS3 mit der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen erkannt (Poehlmann et al. 2006, Braunschweig 2008): Der Knock-down von STAT3 führt zu einer signifikanten Reduktion der Zytotoxizität.

In dieser Arbeit wurden nun die Einflüsse dieser Faktoren auf die zytotoxizitäts-assoziierten Proteine der Granula von NK-Zellen untersucht. Dabei wurde mit transformierten NK-92 Zellen gearbeitet. Für den Knock-down von STAT3 wurde eine siRNA verwendet, die in der Diplomarbeit von Anne Braunschweig evaluiert wurde: diese siRNA konnte die STAT3 Expression um 50% senken. In derselben Arbeit wurde die siRNA für den SOCS3 Knock-down getestet, für die kein direkter Nachweis möglich war. Es konnte lediglich eine verstärkte Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden, nachdem die Zellen mit IL-2 bzw. IL-15 stimuliert wurden. (Braunschweig 2008)

Beide Zytokine, IL-2 und IL-15 wirken u.a. über die Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3 (DiSanto et al. 1997). Auch die Zielgene von SOCS3 können aktiviert werden und so über eine negative Rückkopplung eine eventuelle Phosphorylierung von STAT3 verhindern.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe 2.4) liegen die Unterschiede der beiden Zytokine in ihrem Wirkungsort. Während IL-2 im peripheren Blut die Zytotoxizität von NK-Zellen reguliert und außerdem für das Wachstum von NK-92-Zellen notwendig ist, kommt es in der Dezidua nur unter pathologischen Bedingungen vor. Dort wirkt hauptsächlich das IL-15 Zytokin. (Kitaya et al. 2000)

Die zytotoxizitäts-assoziierten Moleküle Granulysin, Perforin und die verschiedenen Granzyme sind in den Granula der NK-Zellen gespeichert und für die Zytotoxizität gegenüber Zielzellen essentiell. Eine Verbindung zu den STAT-Signaltransduktionswegen konnte bereits 1999 von Yu et al. am Beispiel von Perforin gezeigt werden: mehrere STAT-

Moleküle, darunter auch STAT3, können an eine Bindestelle des Perforin-Promotors binden und so dessen Expression beeinflussen. (Yu et al. 1999) Denkbar wäre demnach, dass die Zytotoxizität von STAT3 über diese Bindestelle und anschließender Induktion der Perforinexpression vermittelt wird. Dabei sind natürlich andere Wirkmechanismen der STAT-Moleküle genauso wenig ausgeschlossen wie die Beteiligung weiterer Signalmoleküle an der Expression der Granula-Inhalte. Auch sind die Einflüsse auf die Zytotoxizität nicht mit den Einflüssen auf die Expression zytotoxizitäts-assoziiierter Proteine gleichzusetzen.

Die Hypothese, dass die Expression von GranzymB ebenfalls von STAT3 reguliert wird, gründet sich auf das Wissen, dass IL-2 zu einer STAT3 Aktivierung führt (s.o.) und wie Zhang et al. 1999 erkannte, dass IL-2 die Perforin und GranzymB Expression stimuliert (Zhang et al., 1999).

Für Granulysin lassen sich ähnliche Regulierungsmechanismen bislang nur vermuten.

Die Ergebnisse dieses Versuches gründen sich auf Messungen der intrazellulären Proteine Granulysin, Perforin und GranzymB nach Markierung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern. Die unterschiedlichen Stimulationsprotokolle haben die Protein-Expression dabei nur bedingt beeinflusst. HLA-G und IL-15 zeigten keine signifikanten Auswirkungen. Und auch die Transfektion mit der STAT3 siRNA ergab keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Ausschaltung von SOCS3 fand sich im Gegensatz zu STAT3 in beinahe allen Versuchen eine erhöhte Granulysin Expression. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Auch die nicht-genomische siRNA zeigte eine leichte Verstärkung der GranzymB und Granulysin Expression.

Das Problem mag darin liegen, dass die zytotoxizitäts-assoziierten Proteine bereits vor dem Knock-down der STAT3 bzw. SOCS3 Proteine in den Granula vorliegen (Janeway et al. 2002) und folglich nur ein geringer Einfluss darauf erreicht werden kann. Damit können nur die bereits schon davor vorhanden gewesenen Proteine detektiert werden und es finden sich keine signifikanten Unterschiede.

Um den Einfluss auf die tatsächliche Neuproduktion von Proteinen festzustellen, wäre es denkbar, bereits vorhandene Proteine über induzierte Sekretion aus der Zelle auszuschleusen, bevor nach der Stimulation bzw. Transfektion die Sekretion der neu produzierten Proteine über Sekretionshemmer verhindert wird. Möglichkeiten dazu bietet z.B. Ionomycin, PMA und BrefeldinA. (Foster et al. 2007)

Zusätzlich ließen sich die verschiedenen Ebenen untersuchen, auf denen die zytotoxische Wirkung der Granula-Inhalte beeinflusst werden kann. Die Transkription der Proteine auf



RNA-Ebene könnte mittels Reverser-Transkription- und anschließender Real-time-PCR untersucht werden. Die Exozytose der zytolytischen Proteine könnte ebenfalls ein Angriffspunkt sein, über den STAT-Moleküle bzw. Zytokine ihre Wirkung entfalten. Nicht zuletzt gibt es auch die Möglichkeit, die Zytotoxizität der NK-Zellen unabhängig von den Granula, z.B. über die Fas/Fas-Liganden Interaktion oder über die Freisetzung zytotoxischer Zytokine (TNF- $\alpha$ ) zu regulieren (Zamai et al. 1998).

Eine Perforin-Expression konnte in keiner der Proben detektiert werden, was sowohl an dem verwendeten Antikörper als auch an der Versuchsanordnung liegen könnte. Die Proteine könnten erst gar nicht in ausreichendem Maße, d.h. über der Nachweisgrenze, produziert, exprimiert oder dann vorzeitig sezerniert worden sein. Mit ähnlichen Protokollen wie oben beschrieben könnte hier das Problem angegangen werden. Des Weiteren wären auch sensitivere Nachweismethoden, beispielsweise auf RNA-Ebene zu erwägen.

## **6.3 NK-Zellen und ihre klinische Relevanz**

### **6.3.1 Stimulation der Ovarien und lokale Verletzung als Einflussgrößen auf NK-Zellen und das immunologische Gleichgewicht**

Es wurde bereits auf die Regulierung und Funktion von NK-Zellen im physiologischen Rahmen der Schwangerschaft eingegangen. Für die Funktion der NK-Zellen im physiologischen sowie pathologischen Gesamtkonzept der Schwangerschaft werden derzeit Interaktionen mit Trophoblasten (Loke et al. 2000), immunregulierenden und vaskularisierungsregulierenden Faktoren (Li et al. 2001), sowie der Zusammenhang mit dem Hormon- und Zytokinstatus (Basu et al. 2000) erforscht.

Das Zeitfenster der Implantation zeichnet sich durch wesentliche molekulare und zelluläre Veränderungen aus, um dem Embryo die Einnistung zu ermöglichen und die darauf folgende Vaskularisierung und Plazentation vorzubereiten. Dabei werden Wachstumsfaktoren, Zytokinrezeptoren und Adhensionsmoleküle vermehrt exprimiert, u.a. von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, die damit ihr „homing“ in die mütterliche Dezidua ermöglichen. (Peralta et al. 2008)

Es wird angenommen, dass die dezidualen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nicht nur über das Immunsystem reguliert werden, sondern auch über Zytokinproduktion selbst auf das immunologische Gleichgewicht Einfluss nehmen und die Trophoblasteninvasion und damit auch die Vaskularisierungsvorgänge während der Plazentation steuern. (Dosiou et al. 2005)

Zu der hormonellen Kontrolle dieses Vorgangs gibt es bislang verschiedene Ansichten. Dosiou et al. diskutierten 2005 ein Modell, in dem Progesteron als maßgeblich für die Wanderung von CD56<sup>bright</sup> Zellen in das Endometrium verantwortlich ist. Dabei wird die Wirkung direkt über die Induktion von „homing“-Rezeptoren oder indirekt über die erhöhte Expression von angiogenen Faktoren, darunter auch VEGF, entfaltet. (Dosiou et al. 2005)

Basu et al. sprechen 2008 dem Östrogen eine Rolle bei der hormonellen Regulation zu (Basu et al. 2008) und van den Heuvel et al. gehen 2005 sogar davon aus, dass das NK-Zell homing über Östrogen induziert und über Progesteron beendet wird (van den Heuvel et al. 2005). Zur weiteren Untersuchung des homing-Verhaltens von Lymphozyten und NK-Zellen wurde kürzlich die Methode der Plazenta-Perfusion mit autologen Zellen publiziert (Heinzelmann et al. 2009).

Wir fanden, dass bei einer Stimulation der Ovarien über einen GnRH-Agonisten im Zeitfenster der Implantation, das Gleichgewicht der NK-Zellpopulationen (CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup>) beeinflusst wird, indem die zytotoxischen CD56<sup>dim</sup> Zellen zunehmen, während die Gesamtpopulation an CD56<sup>+</sup> Zellen abnimmt. Letzteres könnte eine Folge des reduzierten NK-Zell homing in das Endometrium sein, was van den Heuvel et al., auf die Progesteronwirkung zurückführt (van den Heuvel et al. 2005). Auch in unseren Versuchen wurde eine gesteigerte Progesteronkonzentration in stimulierten Patienten nachgewiesen. Ebenso wie Dosiou et al. vermutete, hat dies ebenfalls einen Einfluss auf die VEGF-Konzentration, die nach Stimulation der Ovarien signifikant erhöht war. (Dosiou et al. 2005)

Die Zunahme zytotoxischer NK-Zellen erstaunt auf den ersten Blick, allerdings könnten auch diese zur Abwehr von Pathogenen (Le Bouteiller et al. 2008) und für apoptotische Prozesse (s.u.) eine Funktion erfüllen.

Weiterhin gibt es Arbeiten, die das immunologische Gleichgewicht und Regulierungsfaktoren für die Angiogenese in diesem Zeitfenster untersuchen. Dabei wird zum Einen angenommen, dass eine lokale Verletzung des Endometriums über massive Zytokinsekretion, einer reduzierten Implantationsrate entgegenwirkt (Zhou et al. 2007). Zum Anderen wird IL-6 als wichtiges Zytokin für die Regulierung der Vaskularisierungsvorgänge betrachtet und weiterhin vermutet, dass es für den TH1/TH2-Shift verantwortlich ist und das inflammatorische und anti-inflammatorische Gleichgewicht herstellt. Die These gründet sich auf Versuche zu IL-6 im Zusammenhang mit Patienten mit erhöhter Abortrate. (Gutierrez et al. 2004, Jasper et al. 2007)

Auch hat sich gezeigt, dass der IL-6 Rezeptor in die VEGF-Synthese involviert ist (Christiaens et al. 2008), wodurch wiederum ein indirekter Einfluss auf die dezidualen NK-Zellen vermutet werden kann.

Unsere Ergebnisse dazu weisen darauf hin, dass eine lokale Verletzung des Endometriums vor dem Implantationsfenster die VEGF-Konzentration zwar erhöht, was eine positive Wirkung dieses Eingriffes erklären könnte. Allerdings scheint es keine gute Methode zu sein, um die schädliche Wirkung zu kompensieren, die zuvor durch ein Ungleichgewicht der NK-Zellpopulationen verursacht wurde.

Des Weiteren deuten unsere Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen IL-6 und der Östrogen-Konzentration hin, was auch Doria et al. 2006 postulierte (Doria et al. 2006); allerdings zeigt sich kein Zusammenhang zu der Konzentration an CD56<sup>bright</sup> Zellen. Dies könnte darin seine Ursache haben, dass sich IL-6 zwar auf die VEGF-Konzentration auswirkt, aber VEGF keinen direkten und quantitativen Einfluss auf die CD56<sup>bright</sup> Zellpopulation nimmt. Dennoch kann ein indirekter Einfluss von IL-6, beispielsweise über Regulierung des Th1/Th2- Verhältnisses oder die VEGF- Konzentration, weiterhin vermutet werden. Hier wären weitere Untersuchungen zu dem Zusammenhang von VEGF und NK-Zellen interessant.

Das Projekt wird in infertilen Frauen unter verschiedenen Stimulationsprotokollen weitergeführt. Untersucht werden damit die Auswirkungen von Heparin und Antioxidantien auf die VEGF- und IL-6-Konzentrationen und damit letztlich auf die Abortrate.

### **6.3.2 Wiederholte Spontanaborte im Zusammenhang mit Progesteron und apoptotischen Prozessen**

Apoptose spielt im Verlauf der Schwangerschaft eine wichtige Rolle, sei es zur Eliminierung zytotoxischer Zellen oder zur Beseitigung von „Altmaterial“ bei Umbauvorgängen.

Arruvito et al. fanden dazu einen Progesteronrezeptor auf peripheren NK-Zellen, dessen Aktivierung zum Zelltod dieser Zellen führt. Da die CD56<sup>bright</sup> pNK-Zellen, diesen Rezeptor nicht exprimieren, wird vermutet, dass sie die Vorläuferzellen für deziduale NK-Zellen darstellen. Demnach würde das Schwangerschaftshormon Progesteron eine Apoptose der zytotoxischen NK-Zellen induzieren, während die angiogenen, dezidualen NK-Zellen verschont blieben. (Arruvito et al. 2008)

Auf der anderen Seite kann sich eine erhöhte Apoptose Aktivität auch negativ auswirken. So wurde bei Patienten mit wiederholten Spontanaborten und vermehrten TH1 Immunzellen eine gesteigerte Apoptose Aktivität in Trophoblastzellen gefunden (Lee et al. 2005).

Untersuchungen zu Granulysin, Perforin und GranzymB bei Patienten mit wiederholten Spontanaborten durch gesteigerte Apoptose der Trophoblasten, weisen darauf hin, dass deziduale NK-Zellen für diese apoptotischen Vorgänge verantwortlich sind (Nakashima et al. 2008).

Ratts et al. wiesen im Jahr 2000 auf einen Zusammenhang von Proteinen der Bcl-2 Familie und Apoptose hin. Sie fanden außerdem Bcl-2 als anti-apoptotisches Molekül im gesamten Syncytium der Villi verteilt. Das pro-apoptotische Bax-Protein wurde nur in Zytotrophoblastzellen und perivaskulären Zellen gefunden. (Ratts et al. 2000)

Von De Falco et al. ist bekannt, dass diese Apoptose-assoziierten Proteine während der gesamten Schwangerschaft vorhanden sind: Bcl-2 mit einem konstanten Niveau; die Expression des Bax-Moleküls nimmt ähnlich wie die apoptotischen Zellen im dritten Schwangerschaftstrimester zu. (De Falco et al. 2001)

Weitere Studien auf diesem Gebiet unterstützten die These, es handele sich bei Bcl-2 um ein Protein, dass die Apoptose in der Schwangerschaft reguliere und grundlegend für das Aufrechterhalten einer Schwangerschaft sei. Eine hohe Expression dieses Moleküls verhindere degenerative Prozesse, wie auch die Apoptose in Syncytiotrophoblasten. (Ishihara et al. 2000)

Unsere Versuche gründeten sich deshalb auf die Annahme, dass die Expression von Bcl-2 Molekülen in Patientinnen mit wiederholten Spontanaborten vermindert ist. Dazu wurden Biopsieentnahmen aus dem Endometrium dieser Frauen auf die Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen untersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Histologisch fanden wir dabei weder in der Kontrollgruppe noch in der Patientengruppe mit wiederholten Spontanaborten Auffälligkeiten; sowohl das Mesenchym als auch das kapillare Netzwerk waren gut entwickelt.

Auch das Verteilungsmuster der Immunfärbungen der verschiedenen Proben zeigte sich größtenteils einheitlich. Unterschiede ergaben sich erst in der Intensität der Färbungen. Während bei der Gruppe mit wiederholten Spontanaborten eine diskrete Aktivität für den pro-apoptotischen Marker Bax gefunden wurde, zeigte die Expression der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine in der Kontrollgruppe eine gesteigerte Aktivität im Bereich der uterinen Glandula.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich in Untersuchungen von Allaire et al., Sgarbosa et al. und Barrio et al.. Die Autoren beschrieben ein apoptotisches Profil in Fällen von Diabetes,

Präeklampsie und intrauteriner Wachstumsretardierung, das sich durch vermehrte Bax und/oder reduzierte Bcl-2 Expression kennzeichnet. (Allaire et al. 2000, Barrio et al. 2004, Sgarbosa et al. 2006)

Im Unterschied zu unseren Versuchen, basieren diese Ergebnisse jedoch alle auf Gewebeproben aus der Plazenta. Unsere Untersuchungen am Endometrium deuten darauf hin, dass gesteigerte Apoptosevorgänge bei Frauen mit Spontanaborten bereits vor der Schwangerschaft eine Rolle spielen könnten. Apoptotische Prozesse sind im Verlauf der Schwangerschaft für die zahlreichen Umbauvorgänge zwar notwendig, doch auch hier kommt es auf ein ausgewogenes Gleichgewicht an. Die Neigung zu gesteigerten Apoptoseprozessen könnte zu einer pathologisch verlaufenden Schwangerschaft führen, indem wichtige Zellstrukturen zerstört werden. Ein gut kontrollierter, proteolytischer Prozess ist notwendig, um den Trophoblasten die Invasion in die mütterliche Dezidua und das Einwandern in die Spiralarterien zu ermöglichen. (Sgarbosa et al. 2006)

Interessant wäre nun einen direkten Zusammenhang zu den NK-Zellen herzustellen und zu schauen, inwieweit gesteigerte Apoptosevorgänge mit einem vermehrten Auftreten von zytotoxischen NK-Zellen korrelieren und welche anderen Einflussfaktoren die apoptotischen Prozesse steuern.

## **6.4 Arbeit mit Zelllinien und verschiedenen isolierten Zellen**

Für die Versuche dieser Arbeit wurde sowohl mit der Zelllinie NK-92, als auch mit isolierten Zellen aus Blut, Plazenta und Endometrium gearbeitet. Während primäre NK-Zellen aus menschlichen Organen den tatsächlichen Zustand sicher am besten widerspiegeln, bringen sie Probleme der Patientenbelastung, möglicherweise individuelle Variationen und einen größeren Zeitaufwand mit sich. Auch die Ausbeute an isolierten Zellen, vor allem über Biopsieentnahme, war häufig zu gering, so dass man viele der Versuche wiederholen musste. Dagegen liegen die Vorteile der Arbeit mit Zelllinien in einem einheitlichen Ausgangsmaterial mit Zellen nach relativ geringer Stresssituation. Induzierte Stressantworten könnten sich auf die funktionelle Aktivität der Zellen auswirken. Zelllinien haben andererseits den Nachteil immortalisiert zu sein und nicht in allen Eigenschaften mit ihren Ausgangszellen übereinzustimmen.

Da die NK-92 Zellen Übereinstimmungen in der Expression der charakteristischen Oberflächenmoleküle CD16 und CD56 zeigen, eignen sie sich um Methoden zu etablieren

oder Versuche erstmal zu starten. Dennoch handelt es sich bei dieser Zelllinie um transformierte Zellen, die nicht aus deziduaalem Gewebe stammen. Die Ergebnisse aus diesen Versuchen können nicht notwendigerweise auf deziduale NK-Zellen übertragen werden. Für die Überprüfung ihrer Relevanz, sollten die Experimente mit isolierten Primärzellen wiederholt werden.

## 6.5 Ausblick

Für ein besseres Verständnis über die physiologischen, sowie pathophysiologischen Prozesse einer Schwangerschaft, bietet die Forschung an NK-Zellen und ihrer Funktion in der Dezidua sicher noch großes Potenzial.

Im Konkreten sollten die Liganden für den CD160-Rezeptor identifiziert werden und direkt oder indirekt beeinflusste Signaltransduktionswege genauer untersucht werden. In Frage hierfür kämen stimulierende Interleukine, Hormone, sowie MHC-I Moleküle. Indirekte Effekte könnten über Beeinflussung von STAT3 oder anderen STAT-Molekülen induziert werden. Zudem wäre interessant, ob die STAT-Moleküle neben der Zytotoxizität noch weitere Funktionen der NK-Zelle, wie das „homing“, die Apoptose oder die Trophoblasteninvasion beeinflussen. Ein Zytotoxizitätsassay mit Trophoblasten als Zielzellen nach einem Knock-down von STAT3 oder Stimulierung der NK-Zellen mit IL-15 und HLA-G1s würde hier einen Ansatzpunkt für weitere Versuche bieten. Weiterhin wäre es interessant die Zytokinausschüttung von NK-Zellen nach Stimulation oder Knock down zu untersuchen. Neben GranzymB, Perforin und Granulysin sind in den Granula der NK-Zellen auch noch andere Proteine gespeichert. Vielversprechend scheinen demnach beispielsweise auch Versuche mit GranzymA, GranzymM oder dem KSP-37 Molekül zu sein.

Wir haben gesehen, dass Progesteron die Zytotoxizität der NK-Zellen über Induktion zur Apoptose hemmt. Weitere Untersuchungen mit Progesteron und Östrogen zu deren Einfluss auf zytotoxische Granula-Inhalte der NK-Zellen sowie auf die Fas-, Perforin- und Granzym-Expression der NK-Zellen könnten Aufschluss über Wirkungsweisen dieser Schwangerschaftshormone geben.

Um Störungen des immunologischen Gleichgewichts während der Schwangerschaft aufzudecken, müsste man sein Augenmerk weiter auf die Zytokine, deren Einfluss und Regulation richten. Neben IL-6 als immunregulierendem Zytokin, könnten hier auch

Antioxidantien wie Vitamin E und primär gefäßregulierende Faktoren wie Heparin eine Rolle spielen.

Im Hinblick auf klinisch relevante Themen könnten Untersuchungen an Patientinnen mit Präeklampsie, Aborten oder Frühgeburten unsere Ergebnisse ergänzen. Immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten dieser Plazenten würden weiterführen und eine eventuelle Beteiligung von NK Zellen an der jeweiligen Pathogenese weiter klären.

## 7. Schlussfolgerung

Natürlich Killerzellen und insbesondere die Natürlichen Killerzellen der Dezidua bieten noch weiterhin viel Raum für Forschung auf dem Gebiet der Reproduktionsimmunologie.

Deziduale NK-Zellen haben vielfältige Funktionen, in denen sie sich von den peripheren NK-Zellen unterscheiden. Neben morphologischen Merkmalen mit unterschiedlicher quantitativer Verteilung der Oberflächenrezeptoren, zeigen sie auch ein spezifisches Aktivierungsmuster, bei dem unter anderen auch IL-15, HLA-C und –G, sowie das CD160-Molekül eine Rolle zu spielen scheint. Inwieweit die zytotoxischen Granula-Inhalte für die Funktion der dezidualen Natürlichen Killerzellen eine Rolle spielt, erfordert noch weitergehende Untersuchungen.

Auch die Funktionsweise der Signaltransduktionsmoleküle STAT3 und deren Kontrollregulierung über SOCS3 sind noch nicht vollständig geklärt.

Vieles deutet darauf hin, dass NK-Zellen einen Einfluss auf die Regulation der Trophoblasteninvasion und damit auch auf die Plazentation haben. Folglich könnten sie auch in Schwangerschaftskomplikationen wie der Präeklampsie oder bei Aborten involviert sein. Dabei lässt sich ein Zusammenhang mit Schwangerschaftshormonen, angiogenen sowie immunmodulatorischen Faktoren vermuten. Der Einfluss von antioxidativen und immunregulierenden Faktoren auf das Verhältnis zytotoxischer und angiogener NK-Zellen könnte dabei auch von therapeutischem Interesse sein.

Gewisse Störungen der Schwangerschaft sind außerdem mit einer Fehlregulation Apoptose-assoziiierter Proteine verbunden. Damit haben apoptotische Prozesse für einen erfolgreichen Schwangerschaftsverlauf Bedeutung und deren Regulierung könnte eine weitere Funktion dezidualer NK-Zellen darstellen.



## 8. Literaturverzeichnis

Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. 1990. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4(11):2860-2867.

Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. 2000. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstetrics & Gynecology*, 96(2):271-276.

Arruvito L, Giulianelli S, Flores AC, Paladino N, Barboza M, Lanari C, Fainboim L. 2008. NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *Journal of Immunology*, 180(8):5746-5753.

Backstrom E, Kristensson K, Ljunggren HG. 2004. Activation of natural killer cells: underlying molecular mechanisms revealed. *Scandinavian Journal of Immunology*, 60(1-2): 14-22.

Badawy AM, Khiary M, Sherif LS, Hassan M, Ragab A, Abdelall I. 2008. Low-molecular weight heparin in patients with recurrent early miscarriages of unknown aetiology. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 28(3):280-284.

Barakonyi A, Rabot M, Marie-Cardine A, Aguerre-Girr M, Polgar B, Schiavon V, Bensussan A, Le Bouteiller P. 2004. Cutting edge: engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. *Journal of Immunology*, 173(9):5349-5354.

Barrio E, Calvo MT, Romo A, Alvarez R, Gutiérrez JI, Naval J, Ferrández Longás A. 2004. Intrauterine growth retardation: study of placental apoptosis. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 17(3):451-456.

Basu S, Pioli PA, Conejo-Garcia J, Wira CR, Sentman CL. 2008. Estradiol regulates MICA expression in human endometrial cells. *Clinical Immunology*, 129(2):325-332.

Bates MD, Quenby S, Takakuwa K, Johnson PM, Vince GS. 2002. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss? *Human Reproduction*, 17(9):2439-2444.

Berrington JE, Barge D, Fenton AC, Cant AJ, Spickett GP. 2005. Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry. *Clinical and Experimental Immunology*, 140(2):289-292.

Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC. 2007. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nature Medicine*, 13:1450-1457.

Borghans JA, Noest AJ, De Boer RJ. 1999. How specific should immunological memory be? *Journal of Immunology*, 163(2):569-575.

- Braunschweig A. 2008. Die Funktion von STAT3 und SOCS3 in Natürlichen Killerzellen [Dipomarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Brown MG, Scalzo AA. 2008. NK gene complex dynamics and selection for NK cell receptors. *Seminars in Immunology*;
- Chan CC, Reed GF, Kim Y, Agrón E, Buggage RR. 2004. A correlation of pregnancy term, disease activity, serum female hormones, and cytokines in uveitis. *British Journal of Ophthalmology*, 88(12):1506–1509.
- Chaouat G. 2007. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Seminars in Immunopathology*, 29(2):95-113.
- Chavatte-Palmer P, Guillomot M. 2007. Comparative implantation and placentation. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 64(3):166-174.
- Christiansen OB, Nybo Andersen AM, Bosch E, Daya S, Delves PJ, Hviid TV, Kutteh WH, Laird SM, Li TC, van der Ven K. 2005. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 83(4):821-839
- Crnčić TB, Laskarin G, Frankovic KJ, Tokmadzic VS, Strbo N, Bedenicki I, Le Bouteiller P, Tabiasco J, Rukavina D. 2007. Early pregnancy decidual lymphocytes beside perforin use Fas ligand (FasL) mediated cytotoxicity. *Journal of Reproductive Immunology*, 73(2):108-117.
- DiSanto JP. 1997. Cytokines: shared receptors, distinct functions. *Current Biology*, 7(7):R424-426.
- De Falco M, De Luca L, Acanfora F, Cavallotti I, Cottone G, Laforgia V, De Luca B, Baldi A, De Luca A. 2001. Alteration of the Bcl-2: Bax ratio in the placenta as pregnancy proceeds. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33(7):421-425.
- De M, Wood GW. 1991. Analysis of the number and distribution of macrophages, lymphocytes and granulocytes in the mouse uterus from implantation through parturition. *Journal of Leukocyte Biology*, 50:381-392.
- Doria A, Iaccarino L, Sarzi-Puttini P, Ghirardello A, Zampieri S, Arienti S, Cutolo M, Todesco S. 2006. Estrogens in pregnancy and systemic lupus erythematosus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1069:247-256.
- Dosiou C, Giudice LC. 2005. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocrine Reviews*, 26(1):44-62.
- Dubinsky V, Junovich G, Gentile T, Gutierrez G. 2008. IL-6 as a regulatory factor of the humoral response during pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 60(3):197-203.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK, Link AA, Dimitrov MA, Fisher S, Crane M, Keith S, Kanik KS, Chrousos GP. 2001. IL-12, TNF- $\alpha$ , and Hormonal Changes during Late Pregnancy and Early Postpartum: Implications for Autoimmune Disease Activity during These Times. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(10): 4933-4938.

- Foster B, Prussin C, Liu F, Whitmire JK, Whitton JL. 2007. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Current Protocols in Immunology*, Kapitel 6.24.
- Gaunt G., Ramin K. 2001. Immunological tolerance of the human fetus. *American Journal of Perinatology*, 18(6):299-312.
- Halperin R, Peller S, Rotschild M, Bukovsky I, Schneider D. 2000. Placental apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 50(2):84-87.
- Heibei JA, Goping IS, Barry M, Pinkoski MJ, Shore GC, Green DR, Bleackley RC. 2000. Granzyme B-mediated Cytochrome c Release Is Regulated by the Bcl-2 Family Members Bid and Bax. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(10):1391-1402.
- Heinzelmann J, Enke U, Seyfarth L, Schleussner E, Malek A, Markert UR. 2009. Development of a human model to study homing behaviour of immune cells into decidua and placental villi under ex vivo conditions. *American Journal of Reproductive Immunology*, 61(1):19-25.
- Henderson TA, Saunders PT, Moffett-King A, Groome NP, Critchley HO. 2003. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(1):440-449.
- Higuma-Myojo S, Sasaki Y, Miyazaki S, Sakai M, Siozaki A, Miwa N, Saito S. 2005. Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 54(1):21-29.
- Holländer GA. 2006. *Immunologie, Grundlagen für Klinik und Praxis*. München: Elsevier, 88-91, 92-99, 187-192.
- Hong Y, Wang X, Lu P, Song Y, Lin Q. 2008. Killer immunoglobulin-like receptor repertoire on uterine natural killer cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*
- Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez J, Samoto T, Maruo T. 2000. Changes in proliferative potential, apoptosis and Bcl-2 protein expression in cytotrophoblasts and syncytiotrophoblast in human placenta over the course of pregnancy. *Endocrine Journal*, 47(3):317-327.
- Janeway CA, Travers P. 2002. *Immunologie*. Fünfte Auflage Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 367-369, 387.
- Kameda T, Matsuzaki N, Sawai K, Okada T, Saji F, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T, Tanizawa O. 1990. Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta*, 11(3):205-213.
- Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A, Taketani Y. 2001. Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. *Molecular Human Reproduction*, 7(2):195-200
- Kitaya K, Yasuda J, Yagi I, Tada Y, Fushiki S, Honjo H. 2000. IL-15 expression at human endometrium and decidua. *Biology of Reproduction*, 63:683-687.

- Koc S, Kather A, Markert UR, Dürst M, Schneider A, Kaufmann AM. 2003. Enhancement of immunogenicity of Jeg3 cells by ectopic expression of HLA-A\*0201 and CD80. *American Journal of Reproductive Immunology*, 50(3):243-53.
- Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL. 2003. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *Journal of Experimental Medicine*, 198(8):1201-1212.
- Kopcow HD, Allan DS, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, Ge B, Strominger JL. 2005. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43):15563-15568.
- Krishna Mohan S, Venkataramana G. 2007. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with pregnancy--induced hypertension. *Indian Journal of Physiology & Pharmacology*, 51(3):284-288.
- Lanier LL. 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature Immunology*, 9(5):495-502.
- Le Bouteiller P, Barakonyi A, Giustiniani J, Lenfant F, Marie-Cardine A, Aguerre-Girr M, Rabot M, Hilgert I, Mami-Chouaib F, Tabiasco J, Boumsell L, Bensussan A. 2002. Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26):16963-16968.
- Le Bouteiller P, Blaschitz A. 1999. The functionality of HLA-G is emerging. *Immunological Reviews*; 167:233-244.
- Le Bouteiller P, Piccinni MP. 2008. Human NK cells in pregnant uterus: why there? *American Journal of Reproductive Immunology*, 59(5):401-406.
- Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED, Rouas-Freiss N. 1999. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *International Immunology*, 11(8):1351-1356.
- Ledee N, Dubanchet S, Oger P, Meynant C, Lombroso R, Ville Y, Chaouat G. 2007. Uterine receptivity and cytokines: new concepts and new applications. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 64(3):138-143.
- Lee J, Choi BC, Cho C, Hill JA, Baek KH, Kim JW. 2005. Trophoblast apoptosis is increased in women with evidence of TH1 immunity. *Fertility and Sterility*, 83(4):1047-1049.
- Levy DE, Lee CK. 2002. What does STAT3 do? *Journal of Clinical Investigation*, 109(9):1143-1148.
- Li XF, Charnock-Jones DS, Zhang E, Hiby S, Malik S, Day K, Licence D, Bowen JM, Gardner L, King A. 2001. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86:1823-1834.

- Lightner A, Schust DJ, Chen YB, Barrier BF. 2008. The fetal allograft revisited: does the study of an ancient invertebrate species shed light on the role of natural killer cells at the maternal-fetal interface? *Clinical and Developmental Immunology*, 63:19-20.
- Loke YW, King A. 2000. Decidual natural-killer-cell interaction with trophoblast: cytolysis or cytokine production? *Biochemical Society Transactions*, 28(2):196-198.
- Manaster I, Mandelboim O. 2008. The Unique Properties of Human NK Cells in the Uterine Mucosa. *Placenta*, 29:60-66
- Margni RA, Zenclussen AC. 2001. During Pregnancy, in the Context of a Th2-Type Cytokine Profile, Serum IL-6 Levels Might Condition the Quality of the Synthesized Antibodies. *American Journal of Reproductive Immunology*, 46:181-187
- Markert UR. 2005. *Immunology of Pregnancy*. Basel: Karger-Verlag, 89: 1-2, 10-25, 26-35, 72-83.
- Michimata T, Sakai M, Miyazaki S, Ogasawara MS, Suzumori K, Aoki K, Nagata K, Saito S. 2003. Decrease of T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites occurs in unexplained recurrent spontaneous abortion with normal chromosomal content. *Human Reproduction*, 18(7):1523-1528.
- Miko E, Szereday L, Barakonyi A, Jarkovich A, Varga P, Szekeres-Bartho J. 2008. The role of invariant NKT cells in pre-eclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*, 60(2):118-126.
- Moffett-King A. 2002. Natural Killer Cells and Pregnancy. *Nature Reviews*, 2:656-663.
- Murray PJ. 2005. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24):8686-8691.
- Nakashima A, Shiozaki A, Myojo S, Ito M, Tatematsu M, Sakai M, Takamori Y, Ogawa K, Nagata K, Saito S. 2008. Granulysin produced by uterine natural killer cells induces apoptosis of extravillous trophoblasts in spontaneous abortion. *American Journal of Pathology*, 173(3):653-664.
- Nathan C, Sporn M. 1991. Cytokines in context. *Journal of Cell Biology*, 113(5):981-986.
- Ness R and Sibai B. 2003. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(1):40-49.
- Neumann J. 2008. *Immunbiologie: Eine Einführung*. Springer-Verlag, 156
- Nikolova M, Marie-Cardine A, Boumsell L, Bensussan A. 2002. BY55/CD160 acts as a co-receptor in TCR signal transduction of a human circulating cytotoxic effector T lymphocyte subset lacking CD28 expression. *International Immunology*, 14(5):445-451.
- O'Callaghan CA, Bell JL. 1998. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunological Reviews*, 163:129-138.

- Ohshima K, Nakashima M, Sonoda K, Kikuchi M, Watanabe T. 2001. Expression of RCAS1 and FasL in human trophoblasts and uterine glands during pregnancy: the possible role in immune privilege. *Clinical and Experimental Immunology*, 123(3):481-486.
- Okada S, Li Q, Whitin JC, Clayberger C, Krensky AM. 2003. Intracellular mediators of granulysin-induced cell death. *Journal of Immunology*, 171(5):2556-2562.
- Pathak S, Palan U. 2005. *Immunology: Essential and Fundamental*. Mumbai: Science Publishers, 7-8; 32-36; 252-258.
- Peralta CG, Han VK, Horrocks J, Croy BA, van den Heuvel MJ. 2008. CD56bright cells increase expression of  $\alpha 4$  integrin at ovulation in fertile cycles. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(4):1065-1074.
- Poehlmann TG, Busch S, Mussil B, Winzer H, Weinert J, Mebes I, Schaumann A, Fitzgerald JS, Markert UR. 2005. The possible role of the Jak/STAT pathway in lymphocytes at the fetomaternal interface. *Chemical Immunology and Allergy*, 89:26-35.
- Poehlmann TG, Schaumann A, Busch S, Fitzgerald JS, Aguerre-Girr M, Le Bouteiller P, Schleussner E, Markert UR. 2006. Inhibition of term decidual NK cell cytotoxicity by soluble HLA-G1. *American Journal of Reproductive Immunology*, 56(5-6): 275-285.
- Ponte M, Cantoni C, Biassoni R, Tradori-Cappai A, Bentivoglio G, Vitale C, Bertone S, Moretta A, Moretta L, Mingari MC. 1999. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10):5674-5679.
- Ramon CL, Cajal Y, Martinez RO. 2007. Effects of vitamin E on the response of the fetal middle cerebral artery to the pressure test. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 20(2):133-139
- Rath W, Friese K. 2005. *Erkrankungen in der Schwangerschaft*. Stuttgart: Thieme Verlag, 525
- Ratts VS, Tao XJ, Webster CB, Swanson PE, Smith SD, Brownbill P, Krajewski S, Reed JC, Tilly JL, Nelson DM. 2000. Expression of BCL-2, BAX and BAK in the trophoblast layer of the term human placenta: a unique model of apoptosis within a syncytium. *Placenta*, 21(4): 361-366.
- Rebmann V, P. K, Päßler M, Ferrone S, Maier S, Weiss E, Grosse-Wilde H. 1999. Detection of soluble HLA-molecules in plasma and amniotic fluid. *Tissue Antigens*, 53:14-22.
- Robertson MJ, Ritz J. 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*, 76(12):2421-2438.
- Salafia C, Pezzullo JC, Lopez-Zeno JA, Simmens S, Minior VK, Vintzileos A. 1995. Placental pathologic features of preterm preeclampsia. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 173(4):1097-1105.



- Schaumann A. 2003. Einfluss von HLA-G1s auf die Proliferation und Zytotoxizität von NK92-Zellen und NK-Zellen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Scholl TO, Chen X, Sims M, Stein TP. 2006. Vitamin E: maternal concentrations are associated with fetal growth. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(6):1442-1448.
- Sgarbosa F, Barbisan LF, Brasil MA, Costa E, Calderon IM, Gonçalves CR, Bevilacqua E, Rudge MV. 2006. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 73(2):143-149.
- Sharkey AM, King A, Clark DE, Burrows TD, Jokhi PP, Charnock-Jones DS, Loke YW, Smith SK. 1999. Localization of Leukemia Inhibitory Factor and Its Receptor in Human Placenta Throughout Pregnancy. *Biology of Reproduction*, 60:355-364.
- Sharkey AM, Gardner L, Hiby S, Farrell L, Apps R, Masters L, Goodridge J, Lathbury L, Stewart CA, Verma S, Moffett A. 2008. Killer Ig-like receptor expression in uterine NK cells is biased toward recognition of HLA-C and alters with gestational age. *Journal of Immunology*, 181(1):39-46.
- Stauber M, Weyerstahl T. 2005. Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart: Thieme-Verlag, 2.Auflage: 460-469.
- Staun-Ram E, Shalev E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3-56.
- Szekeres-Bartho J. 2002. Immunological relationship between the mother and the fetus. *International Reviews of Immunology*, 21(6):471-495.
- Takeuchi O, Akira S. 2007. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunological Reviews*, 220(1):214-224.
- Tibbetts TA, Conneely OM, O'Malley BW. Progesterone via Its Receptor Antagonizes the Pro-Inflammatory Activity of Estrogen in the Mouse Uterus. 1999. *Biology of Reproduction*, 60:1158-1165.
- Trowsdale J, Moffett A. 2008. NK receptor interactions with MHC class I molecules in pregnancy. *Seminars in Immunology*
- Walter LM, Rogers PAW, Girling JE. 2005. The role of progesterone in endometrial angiogenesis in pregnant and ovariectomised mice. *Reproduction*, 129:765-777.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology Today*, 14(7):353-356.
- Wormald S, Hilton DJ. 2004. Inhibitors of cytokine signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2):821-824.
- Yu CR, Ortaldo JR, Curiel RE, Young HA, Anderson SK, Gosselin P. 1999. Role of a STAT binding site in the regulation of the human perforin promoter. *Journal of Immunology*, 162:2785-90.

Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. 1998. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *Journal of Experimental Medicine*, 188(12):2375-80.

Zhang J, Scordi I, Smyth MJ, Lichtenheld MG. 1999. Interleukin 2 receptor signaling regulates the perforin gene through signal transducer and activator of transcription (STAT) 5 activation of two enhancers. *Journal of Experimental Medicine*, 190:1297-1308.



## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Embryos während der Implantation und seiner Grenzfläche mit dem Endometrium. (verändert nach: Glenn G et al. 2001)

Abbildung 2: Darstellung der Kompartimente, Zelltypen und Antigenexpression der Plazenta. (verändert nach: [www.cmc.cuk.ac.kr/webboard/data/topic/20010703\(HSY\).ppt](http://www.cmc.cuk.ac.kr/webboard/data/topic/20010703(HSY).ppt) Entnommen am 07.08.2008)

Abbildung 3: Der JAK/STAT Signalweg. (verändert nach: [genomebiology.com/2004/5/12/253](http://genomebiology.com/2004/5/12/253). Entnommen am 19.10.2008)

Abbildung 4: Zytolyse-Mechanismen von NK-Zellen. (verändert nach: Burmester GR et al. 2003)

Abbildung 5: Modell der hormonellen Regulation der NK-Zellen in der Schwangerschaft. (verändert nach: Dosiou et al., 2005)

Abbildung 6: Ficoll Gradient

Abbildung 7: Rezeptorexpression von CD160 auf peripheren Lymphozyten.

Abbildung 8: Expression von CD160 auf dezidualen Lymphozyten (I.), NK-Zellen (II.) und T-Zellen (III.).

Abbildung 9: Vergleich der CD160 Expression von Lymphozyten bzw. NK-Zellen des peripheren Blutes und der Dezidua.

Abbildung 10: Expression von Granzym B auf NK-92.

Abbildung 11: Expression von Granulysin auf NK-92.

Abbildung 12: Auswirkungen einer Stimulation der Ovarien auf das NK-Zell homing

Abbildung 13: Auswirkungen einer Stimulation der Ovarien auf die Progesteron Konzentration im Serum

Abbildung 14: Auswirkungen einer Stimulation der Ovarien auf das Gleichgewicht der NK-Zellen

Abbildung 15: Auswirkungen einer lokalen Verletzung auf das Gleichgewicht von NK-Zellen

Abbildung 16: Auswirkungen einer lokalen Verletzung auf die VEGF Konzentration im peripheren Blut und im Endometrium.

Abbildung 17: Zusammenhang der IL-6 und Östradiol Konzentrationen bzw. der Konzentration der CD56 bright Zellpopulation.

Abbildung 18: Endometrium in der proliferativen Phase.

Abbildung 19: Endometrium in der östrogenen Phase. Immunohistochemische Reaktion von Bcl-2 bei der Kontrollgruppe.

Abbildung 20: Endometrium in der östrogenen Phase. Immunohistochemische Reaktion von Bcl-2 bei der Patientengruppe mit wiederholten Spontanaborten.

Abbildung 21: Endometrium in der östrogenen Phase. Immunohistochemische Reaktion von Bax bei der Kontrollgruppe

Abbildung 22: Endometrium in der östrogenen Phase. Immunohistochemische Reaktion von Bax bei Frauen mit wiederholten Spontanaborten

## **Danksagung**

Danken möchte ich vor allem Herrn PD Dr. med. Udo Markert für die Betreuung dieser Doktorarbeit und insbesondere für die großen Hilfestellungen, ohne die die wertvollen Auslandsaufenthalte im Rahmen dieser Arbeit nicht zustande gekommen wären.

Mein Dank gilt dabei auch Dr. Gabriela Gutierrez in Buenos Aires und Dr. Sylvia Daher in Sao Paulo für deren Betreuung während dieser Forschungsaufenthalte und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht darüber hinaus.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Böhringer Ingelheim Fonds, Jenapharm für das Loder-Stipendium, sowie dem DAAD für den Reisezuschuss. Damit konnte ich mich in meinem Forschungsjahr uneingeschränkt dieser Arbeit widmen und die Forschungsaufenthalte finanzieren.

Weiterhin bedanke ich mich besonders bei Gisela Junovich und Erica Giovana für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit und deren moralische Unterstützung.

Dem Team des Plazentalabors danke ich für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen, darunter auch Tobias Pöhlmann und Susanne Busch. Anne Braunschweig danke ich besonders für die nette und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die hier ungenannt bleiben, auf die ich mich immer verlassen konnte und die mich unterstützten wo immer es ihnen möglich war.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe,

mich PD Dr. Udo Markert, Dr. Gabriela Gutierrez und Dr. Silvia Daher bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Bereitstellung des Manuskripts unterstützt haben,

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,

dass ich die Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 07.06.2010

---

Yvonne Maier